



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1540号
学位記番号	第316号
氏名	落合 なつき
授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	脂肪細胞分化促進因子 fad24 が初期胚発生および筋再生において担う機能の解析
論文審査担当者	主査： 服部 光治 副査： 今川 正良，肥田 重明，田中 正彦

名古屋市立大学学位論文

脂肪細胞分化促進因子 *fad24* が
初期胚発生および筋再生において担う機能の解析

平成 27 年度（西暦 2016 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科

分子生物薬学分野

落合 なつき

1. 本論文は、2016 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査	服部	光治	教授
副査	今川	正良	教授
	肥田	重明	教授
	田中	正彦	准教授

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Natsuki Ochiai, Makoto Nishizuka, Tomomi Miyamoto, Ichiro Miyoshi, Masahito Ikawa, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
Targeted disruption of *fad24*, a regulator of adipogenesis, causes pre-implantation embryonic lethality due to the growth defect at the blastocyst stage.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **438**: 301-305 (2013)

Natsuki Ochiai, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
Fad24, a positive regulator of adipogenesis, is required for S phase re-entry of C2C12 myoblasts arrested in G0 phase and involved in p27^{Kip1} expression at the protein level.
Biological and Pharmaceutical Bulletin, **39**: 807-814 (2016)

本論文の基礎となる研究は、今川正良教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目 次

緒論	1
本論	3
第一章 <i>fad24</i> 欠損がマウス初期胚発生に与える影響の解析	
第一節 <i>fad24</i> 欠損マウスの樹立	3
第二節 <i>fad24</i> 欠損胚が死亡する発生ステージの検討	15
第三節 <i>fad24</i> 欠損が初期胚発生に与える影響の解析	16
第四節 <i>fad24</i> 欠損が桑実胚の細胞数に与える影響	21
第五節 考察および小括	24
第二章 <i>fad24</i> が骨格筋再生において担う機能の解析	
第一節 ヘビ毒 cardiotoxin (CTX) による <i>fad24</i> , <i>hbo1</i> の発現変化	27
第二節 <i>fad24</i> が C2C12 細胞の筋分化に与える影響の解析	30
第三節 <i>fad24</i> が C2C12 細胞の増殖停止/再開に与える影響の解析	33
第四節 細胞周期活性化抑制因子 p27 ^{Kip1} の発現に <i>fad24</i> 発現抑制が与える影響	38
第五節 考察および小括	42
総括	45
結論	48
謝辞	49
引用文献	50

略 語

ATF	activating transcription factor
BSA	bovine serum albumin
CDK	cyclin-dependent kinase
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CKI	CDK inhibitor
CTX	cardiotoxin
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
d. d. w.	distilled deionized water
ECL	enhanced chemiluminescence
Fad	factor for adipocyte differentiation
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
HBO1	histone acetyltransferase binding to ORC1
IVF	in vitro fertilization
hCG	human choriogonadotropin
hNRP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles
MCE	mitotic clonal expansion
Mcm10	minichromosome maintenance 10
Noc3p	nucleolar complex-associated protein 3p
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
PVDF	polyvinylidene difluoride
RPL7	60S ribosomal protein L7
Rpo1-2	RNA polymerase 1-2
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	short hairpin RNA

緒 論

肥満は、糖尿病をはじめとする生活習慣病の主要なリスクファクターである。肥満の形成には、脂肪細胞の肥大化のみならず、前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へと分化することによる脂肪細胞数の増加が重要であることが知られている (1)。肥満の根本的な治療のために、脂肪細胞分化の分子機構を明らかにすることは極めて重要である。

脂肪細胞分化過程においては、様々な因子が機能し、複雑な制御機構を形成している (2, 3)。脂肪細胞分化後期過程における分子機構については明らかとなりつつある一方で、分化初期過程の分子メカニズムについては不明な点が多く残されていた (4)。そこで当研究室では、脂肪細胞分化の初期過程を制御する分子機構を解明するために、脂肪細胞分化誘導後 3 時間に発現が上昇する遺伝子を PCR-subtraction 法により 102 クローン単離した (5, 6)。単離した遺伝子のいくつかは新規遺伝子であり、その中の一つを *factor for adipocyte differentiation 24 (fad24)* と名付けた (Fig. 1)(7)。これまでに、*fad24* を含む複数の新規遺伝子について、脂肪細胞分化に重要であることを報告している (7-11)。

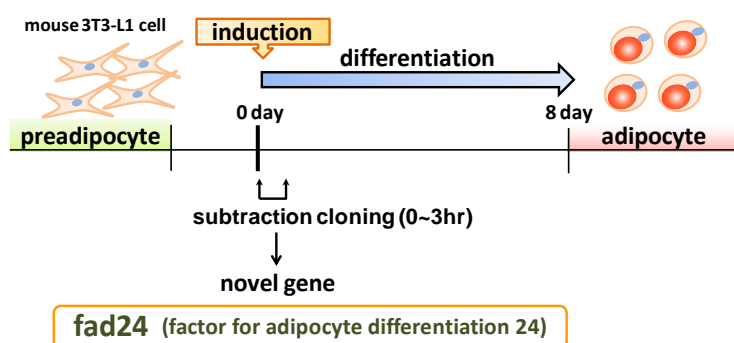


Fig. 1. Identification of *fad24*.

fad24 は、現在では DNA 複製や rRNA 生合成を制御する酵母 nucleolar complex-associated protein 3p (Noc3p) の哺乳類におけるオルソログであることがわかっており、Noc3l (NOC3-like DNA replication regulator) という遺伝子名でも呼ばれている (12)。種間で高度に保存されており、主要なドメインとして、bZIP-like domain と Noc domain を有している (Fig. 2)(7)。bZIP-like domain は、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ファミリーや activating transcription factor (ATF) ファミリー等の転写因子が持つ bZIP domain と類似した構造である (7, 13)。60S ribosomal protein L7 (RPL7) や 30-40 S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles (hnRNP) といった因子が持つ塩基性アミノ酸に富んだジッパー様ドメインは、ホモ二量体形成や RNA への結合等に関与していることが報告されている (14, 15)。しかし、FAD24 の bZIP-like domain の機能についてはよくわかっていない。Noc domain は Noc1p, 3p, 4p に共通してみられる配列であり、酵母で pre-rRNA プロセッシングやタンパク質間相互作用に重要であることが明らかとされてい

本 論

第一章 *fad24* 欠損がマウス初期胚発生に与える影響の解析

第一節 *fad24* 欠損マウスの樹立

生体内における *fad24* の役割をより詳細に解明するためには、過剰発現マウスに加えて *fad24* 欠損マウスの解析が必要である。マウス *fad24* は 19 番染色体上にコードされており、21 個のエキソンを有する。その first ATG はエキソン 1 に存在している。当研究室ではエキソン 1 を標的とした 3 種類のターゲティング・ストラテジーを用いて *fad24* 欠損マウスの樹立をこれまでに試みたが、いずれにおいても組換え ES 細胞を得ることはできなかった。そこで本研究では、ネオマイシン耐性遺伝子とエキソン 6 から 9 の一部を置き換えるストラテジーを用いて、*fad24* 欠損マウスの樹立を目指した (Fig. 3A)。エキソン 6 から 9 の一部を欠損すると、フレームシフトにより FAD24 の 187 番目のアミノ酸から変異が生じ、194 番目のアミノ酸が終止コドンへと変化する (Fig. 3B)。

pNT1.1 プラスミドに short arm 2 kbp が組み込まれたプラスミド (pNT1.1-short arm) は、当研究室で既に構築されていた。そこで、このプラスミドに long arm 7 kbp を挿入して *fad24* KO ベクターを作製し、ES 細胞に導入した。

fad24 欠損マウスの樹立は、大阪大学教授 伊川 正人先生との共同研究で行った。*fad24* KO ベクターの ES 細胞への導入、組換え ES 細胞のネオマイシンセレクションおよび ES 細胞からのゲノムの調製は、大阪大学に依頼した。

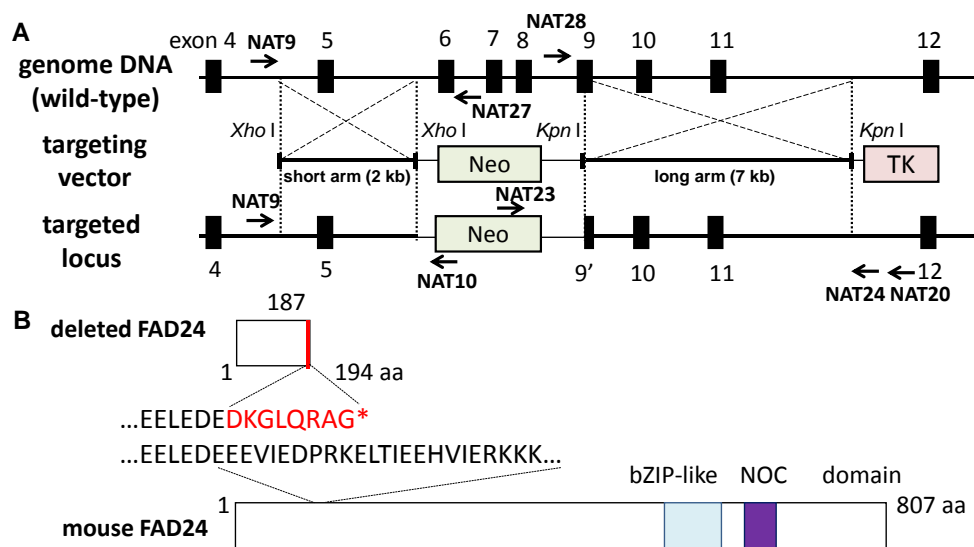


Fig. 3. Generation of *fad24* knockout mice. (A) Schematic representation of the *fad24* locus, the targeting vector, and the targeted locus. The black boxes represent exon 4 to 12 of *fad24* gene. Arrows show the primers used for PCR analyses. The targeting vector includes a neomycin resistance gene (Neo) and thymidine kinase gene (TK). (B) The schematic structure of deleted mouse FAD24. Asterisk means the C-terminal end.

(1-1) *fad24* ターゲティングベクターの作製と導入

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

pGEM-T-long arm (当研究室で構築済)
 pNT1.1-short arm (当研究室で構築済)
 PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (invitrogen)
 PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (invitrogen)
 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
 JM109 competent high Competent cell Kit (TOYOBO)
 2 x ligation solution I (Takara)
*Kpn*I (TOYOBO)
*Not*I (TOYOBO)

1-2 実験方法

◇ フラグメント回収によるインサートの調製

<i>Kpn</i> I	10.0 μ l
10 x low buffer	10.0 μ l
d. d. w.	45.0 μ l
<u>plasmid (0.35 μg/μl)</u>	<u>35.0 μl (12 μg)</u>
total	100.0 μ l

pGEM-T-long arm 12 μ g 相当を *Kpn*I 処理し、long arm (7.0 kbp) を pGEM-T-vector から切り出した。フラグメントをアガロース電気泳動法により pGEM-T-vector と分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

◇ BAP 処理によるベクターの調製

<i>Kpn</i> I	10.0 μ l
10 x low buffer	10.0 μ l
d. d. w.	55.0 μ l
<u>plasmid (0.44 μg / μl)</u>	<u>25.0 μl (11.0 μg)</u>
total	100.0 μ l

pNT1.1-short arm 11.0 μ g 相当を *Kpn*I で直線化した。得られた直線化 pNT1.1-short arm を TE 飽和フェノールおよび CIAA で処理し、エタノール沈殿で精製した後に Bacterial alkaline phosphatase (BAP) 2.5 μ l を加えて 60 °C, 60 分間インキュベートした。TE 飽和フェノールで 3 回処理し、BAP を失活させた後、CIAA を加えて上清を回収した。これをエタノール沈殿で精製し、TE に溶解してライゲーションに使用した。

◇ ライゲーション

ベクター50 ng に対して 1 : 3, またはベクター25 ng に対して 1 : 6 の比率でインサートを混合し、2 x ligation solution I を加えて 11 μ l の反応液を調製した。16 °C 恒温槽で約 23 時間、インキュベートした。

◇ トランスフォーメーション

JM109 (titer 2.73×10^9 colonies/ μ g) 20 μ l に ligation solution 2 μ l を加え、氷上で 20 分間静置した。その後 42 °C で 30 秒ヒートショックし、速やかに氷上に移して 2 分間静置した後、火炎滅菌下で液体培地 SOC を 180 μ l 加えた。37 °C で 60 分間インキュベートし、LB Amp (+)寒天培地プレートに塗布して、37 °C で約 15 時間インキュベートした。

◇ プラスミドの調製

トランスフォーメーションにより得られたコロニーを LB Amp (+) 培地 4 ml に植菌し、PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (invitrogen) を用いてプラスミドを精製した。得られたプラスミドは、制限酵素処理およびシーケンスにより、目的のプラスミドであることを確認した。

(2) 実験結果

① Vector : insert = 1 : 3 のプレートでは 5 個、② 1 : 6 のプレートでは 16 個のコロニーが得られた。そこで、①のプレートから 5 個、②のプレートから 14 個のコロニーをピックアップし、プラスミドを調製した。3 種類の制限酵素およびシーケンスにより得られたプラスミドを確認したところ、目的のプラスミド (*fad24* KO ベクター) が 2 クローン得られた。このうちの 1 つを以降の実験に使用した。

(1-2) 組換え ES 細胞のスクリーニングおよび *fad24* ヘテロ欠損マウスの樹立

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験動物

本検討で用いた動物は、明暗 12 時間サイクル、室温 23 °C、湿度 52–59% の環境で飼育した。すべての動物実験は「名古屋市立大学動物実験規程」に基づいて行った。

1-2 実験材料

fad24 KO ベクター (本論第一章 第一節 (1) で構築)

pNT1.1-positive (当研究室で構築済)

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)

ES 細胞由来ゲノム DNA (大阪大学遺伝情報実験センターに依頼)

フェザー滅菌カミソリ替え刃 (フェザー)

tail prep buffer : 0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl, pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS、
500 µg/ml Proteinase-K (PCR grade, Roche)

phenol/CIAA : phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

1-3 実験方法

◇ *fad24* KO ベクターの調製

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて調製した *fad24* KO ベクターを 1.0 µg/µl に希釈し、大阪大学微生物研究所附属感染動物実験施設に送付した。

◇ ES 細胞培養、トランスフェクションおよびゲノム DNA の調製
大阪大学微生物研究所附属感染動物実験施設に依頼した。

◇ 組換え ES 細胞のスクリーニング

fad24 KO ベクターを導入した ES 細胞のゲノム DNA をテンプレートとし、PCR 法を用いて組換え ES 細胞のスクリーニングを行った。

【5'側スクリーニング】

プライマーとして *fad24* 配列を認識する NAT9 プライマー、およびネオマイシン耐性遺伝子配列を認識する NAT10 プライマーを用いた (Figs. 3A, 4)。PCR 反応は、以下に示す条件で PCR Thermal cycler Dice (Takara) を用いて行った。テンプレートには、ES 細胞ゲノム原液 1 μ l を使用した。また、ポジティブコントロールとして、pNT1.1-positive プラスミドをマウスゲノム溶液で 1.0 μ g/ μ l に希釈して使用した。pNT1.1-positive は、pNT1.1 に、short arm より 5'側に約 1 kbp 長く、NAT9 が認識する配列を含む配列 (positive arm) が挿入されているプラスミドである (Fig. 4)。

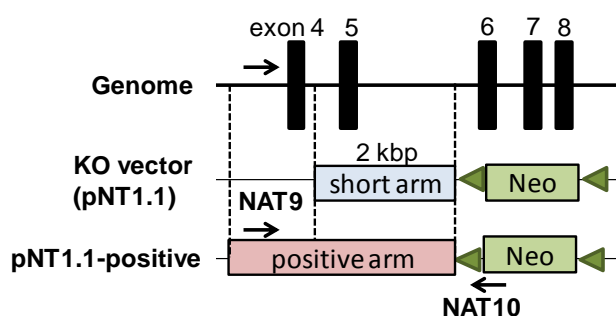


Fig. 4. Schematic structure of pNT1.1-positive plasmid.

〈反応液組成〉

10 x LA Taq PCR Buffer II	1.50 μ l
dNTP mixture (2.5 mM)	2.40 μ l
25 mM MgCl ₂	1.50 μ l
5 units/ μ l LA Taq (Takara)	0.20 μ l
10 μ M 5' primer	0.75 μ l
10 μ M 3' primer	0.75 μ l
d. d. w.	6.95 μ l
genome DNA	1.00 μ l
	15.0 μ l

反応条件

1 cycle : 94 °C 1 min

40 cycle : 94 °C 30 sec, 64 °C 30 sec, 72 °C 3 min

1 cycle : 72 °C 4 min

〈プライマー〉

NAT 9 primer : 5' – agctgccattagcatatagcagcc – 3'

NAT10 primer : 5' – acttcacggatccggaaccetta – 3'

【3'側スクリーニング】

プライマーとしてネオマイシン耐性遺伝子配列を認識する NAT23 プライマー、および *fad24* 配列を認識する NAT20 プライマーを用いた (Fig. 3A)。PCR 反応は、以下に示す条件で PCR Thermal cycler Dice Gradient (Takara) を用いて行った。テンプレートには、ES 細胞ゲノム原液 1 µl を使用した。

〈反応液組成〉

2 x PCR Buffer for KOD FX	10.0 µl
dNTP mixture (2.0 mM)	4.0 µl
1 units/µl KOD FX (TOYOBO)	0.4 µl
10 µM 5' primer	0.6 µl
10 µM 3' primer	0.6 µl
d. d. w.	3.4 µl
<u>genome DNA</u>	<u>1.0 µl</u>
	20.0 µl

反応条件

1 cycle : 94 °C 2 min

40 cycle : 98 °C 10 sec, 54.1 °C 30 sec, 68 °C 9 min

〈プライマー〉

NAT23 primer : 5' – tagtgagacgtgctacttcatttg – 3'

NAT20 primer : 5' – gctccaaccaacctaagggttaa – 3'

◇ 組換え ES 細胞の仮親への移植およびキメラマウスの作製
大阪大学遺伝情報実験センターに依頼した。

◇ マウスのゲノム DNA の調製

マウス尾の先端部分を滅菌刀で約 3 mm 切断し、tail prep buffer 200 μ l を添加して、55 °C で一晩インキュベートした。これを phenol/CIAA 200 μ l で処理し、得られた上清をジェノタイピングに使用した。

◇ PCR による遺伝子型の決定

PCR 反応は、PCR Thermal cycler Dice (TaKaRa) を用いて行った。テンプレートには、マウスのゲノム溶液を滅菌水で 64 倍に希釈したものをを用いた。

【5'側ジェノタイピング】

プライマーは、野生型アリル、組換えアリル共通のプライマーとして NAT9 プライマーを用いた。また、野生型アリル特異的なプライマーとして NAT27 プライマー、組換えアリル特異的なプライマーとして NAT10 プライマーを用いた (Fig. 3A)。

〈反応液組成〉

2 x PCR Buffer for KOD FX	7.50 μ l
dNTP mixture (2.0 mM)	3.00 μ l
1 units/ μ l KOD FX (TOYOBO)	0.30 μ l
10 μ M NAT9 primer	0.45 μ l
10 μ M NAT10 or 27 primer	0.45 μ l
d. d. w.	1.30 μ l
<u>genome DNA</u>	<u>2.00 μl</u>
	15.00 μ l

反応条件

1 cycle : 94 °C 2 min

35 cycle : 98 °C 10 sec, 62 °C 30 sec, 68 °C 3 min 30 sec

〈プライマー〉

NAT 9 primer :	5' – agctgccattagcatatagcagcc – 3'
NAT10 primer :	5' – acttcateggatccggaaccctta – 3'
NAT27 primer :	5' – caggctgagtttgaactactggca – 3'

【3'側ジェノタイピング】

プライマーは、野生型アリル、組換えアリル共通のプライマーとして NAT24 プライ

マーを用いた。また、野生型アリル特異的なプライマーとして NAT28 プライマー、組換えアリル特異的なプライマーとして NAT23 プライマーを用いた (Fig. 3A)。

〈反応液組成〉

2 x PCR Buffer for KOD FX	10.0 μ l
dNTP mixture (2.0 mM)	4.0 μ l
1 units/ μ l KOD FX (TOYOBO)	0.4 μ l
10 μ M 5' primer	0.6 μ l
10 μ M 3' primer	0.6 μ l
d. d. w.	3.4 μ l
<u>genome DNA</u>	<u>1.0 μl</u>
	20.0 μ l

反応条件

1 cycle : 94 °C 2 min

40 cycle : 98 °C 10 sec, 54.1 °C 30 sec, 68 °C 9 min

〈プライマー〉

NAT23 primer : 5' – tagtgagacgtgctacttccatttg – 3'

NAT24 primer : 5' – cacgcccagcagatttcagtatt – 3'

NAT28 primer : 5' – taccatctggtcatgtgactactttg – 3'

(2) 実験結果

fad24 KO ベクターを導入した 129 系マウス由来 ES 細胞 96 クローン、GBGS 系マウス由来 ES 細胞 96 クローンをスクリーニングしたが、*fad24* KO ベクターが組み込まれた組換え ES 細胞は得られなかった。そこで再度、*fad24* KO ベクターを大阪大学遺伝子情報実験センターに送付し、ES 細胞に導入した。得られた EGR-G01 (129S2 x C57BL/6Cr Slc) ES 細胞 384 クローンをスクリーニングした結果、9A, 35F, 53B の 3 クローンにおいて short arm 側の組換えが起きていることが確認できた (Fig. 5A)。次に、この 3 クローンについて long arm 側の組換えを PCR 法で確認したところ、3 クローンとも *fad24* KO ベクターと相同組換えを起こしていることがわかった (Fig. 5B)。そこで、この 3 クローンを大阪大学遺伝子情報実験センターにおいて仮親に移植した。

移植により得られたキメリズム 90 %以上の雄性キメラマウスを C57BL/6J 雌性マウスと交配し、F1 世代マウスを作製した。5'側のジェノタイピング PCR 反応を行い、組換えアリルがマウスゲノムに組み込まれていることを確認した (Fig. 5C)。雄性マウス、雌性マウス

ともに *fad24* ヘテロ欠損マウスが生まれ、正常に発育し、外観は野生型マウスと明確な違いは見られなかった。また、C57BL/6J 系統へと戻し交配を行った野生型および *fad24* ヘテロ欠損マウスのゲノムを用いて 3'側のジェノタイピング PCR を行い、組換えアレルがマウスゲノムに組み込まれていることを確認した (Fig. 5D)。

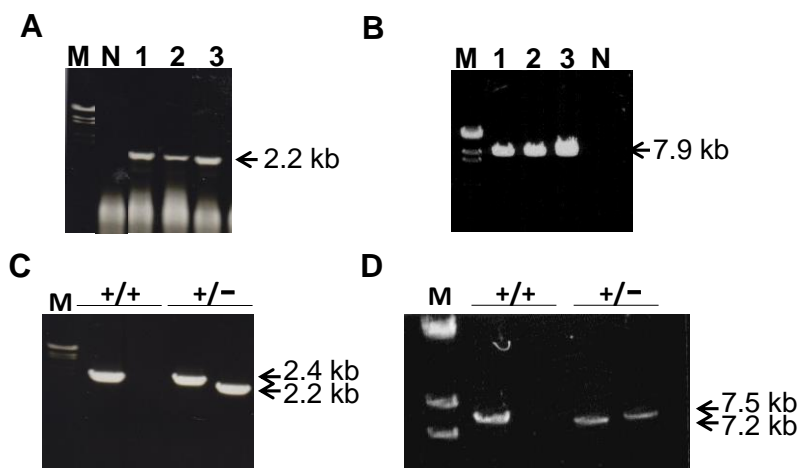


Fig. 5. Generation of *fad24* KO mice. (A) PCR analysis to detect short arm recombination in transfected ES cells using primers NAT9 and NAT10. The length of PCR products from the targeted allele is 2.2 kb. (B) PCR analysis to detect long arm recombination in transfected ES cells using primers NAT23 and NAT20. The length of PCR products from the targeted allele is 7.9 kb. Genomic DNA prepared from untransfected ES cell was used as a negative control (N). M; size marker. (C) 5' genotyping of *fad24*^{+/+} and *fad24*^{+/-} mice by PCR analysis. The length of PCR products in wild-type allele when used the primers NAT9 and NAT27, and in the targeted allele when used the primers NAT9 and NAT10 are 2.4 and 2.2 kb, respectively. (D) 3' genotyping of *fad24*^{+/+} and *fad24*^{+/-} mice by PCR analysis. The length of PCR products in wild-type allele when used the primers NAT28 and 24, and in the targeted allele when used the primers NAT23 and NAT24 are 7.2 and 7.5 kb, respectively.

(1-3) *fad24*ヘテロ欠損マウスにおける *fad24* mRNA 発現量の解析

第一章 第一節 (1-2) で樹立した *fad24* ヘテロ欠損マウスは、エキソンの 6 から 9 の一部を標的として *fad24* をノックアウトしているため、組換えを起こしたゲノムから、エキソン 1 から 5 に由来する変異 *fad24* mRNA が転写されている可能性がある (Fig. 3)。エキソン 2 と 3 にアニールし、変異 *fad24* mRNA と正常な *fad24* mRNA の両方を認識するプライマーと、エキソン 17 と 18 にアニールし、正常な *fad24* mRNA のみを認識するプライマーの二種類を用いて、ヘテロ欠損マウスにおける *fad24* mRNA の発現量を検討した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

*fad24*ヘテロ欠損マウス

RNAiso Plus (TaKaRa)

ReverTra Ace α - (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

SYBR premix EX Taq II (Takara Bio)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール (ナカライテスク)

フェザー滅菌カミソリ替え刃 (フェザー)

tail prep buffer : 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS,
500 µg/ml Proteinase-K (PCR grade, Roche)

phenol/CIAA : phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

1-2 実験方法

◇ Total RNA の調製

生後 1 週齢のマウスを CO₂ により安楽死させ、肝臓ならびに肺を摘出して TriPure でホモジナイズした。クロロホルム抽出、2-プロパノール沈殿後、得られた RNA を DEPC-d.d.w.に溶解した。

◇ cDNA の調製

逆転写反応は ReverTra Ace -α- を用いて、以下の条件により行った。

〈反応液組成〉

Total RNA (0.1 µg/µl)	10.00 µl
RNase free H ₂ O	2.60 µl
5 x RT buffer	4.00 µl
dNTP mixture	2.00 µl
Random primer	1.00 µl
RNase inhibitor	0.25 µl
ReverTra Ace	0.15 µl
<hr/>	
	20.00 µl

〈反応条件〉

30 °C 10 min、42 °C 20 min

逆転写反応産物は、熱湯で 5 min ボイルした後、氷上に移して急冷し、5 min 以上静置してから検討に用いた。

◇ マウスのゲノム DNA の調製

マウス尾の先端部分を滅菌刀で約 1 cm 切断し、tail prep buffer 300 µl を添加して、

55 °C で一晩インキュベートした。これを phenol/CIAA 300 µl で 2 回処理し、得られた上清をジェノタイピングに使用した。

◇ PCR による遺伝子型の決定

マウスの遺伝子型は 5'側ジェノタイピングにより決定した。条件は第一章 第一節 (1-2) に準じた。

◇ 定量 PCR

エキソン 2 から 3 を標的とした *fad24* mRNA 発現量の検討は ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) の条件に準じて行った。プライマーならびにプローブセットは Applied Biosystems より購入した。18S rRNA ならびにエキソン 17 から 18 を標的とした *fad24* mRNA 発現量の検討は、SYBR premix EX Taq II (Takara Bio) の条件に準じて行った。18S rRNA のプライマーは、以前に報告されたものと同じ配列を用いた (24)。

〈プライマーおよびプローブ〉

fad24 (exon2-3): Mm00457924_m1

<i>fad24</i> (exon17-18):	5' primer (MAK143)	5'-gcctgcatgtcatgctaagc-3'
	3' primer (MAK144)	5'-cctccagctcaggtagaaac-3'
18S rRNA :	5' primer (KOB3)	5'-gtaacccgttgaaacccatt-3'
	3' primer (KOB4)	5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'

(2) 実験結果

生後 1 週齢の野生型および *fad24* ヘテロ欠損マウスから肝臓、肺を摘出し、*fad24* mRNA 発現量を検討した (n=4)。その結果、肝臓、肺の両臓器において、エキソン 2 から 3 を認識するプライマーを用いた場合とエキソン 17 から 18 を認識するプライマーを用いた場合のいずれにおいても、野生型マウスとヘテロ欠損マウスで *fad24* mRNA の発現量に差は見られなかった (Fig. 6)。

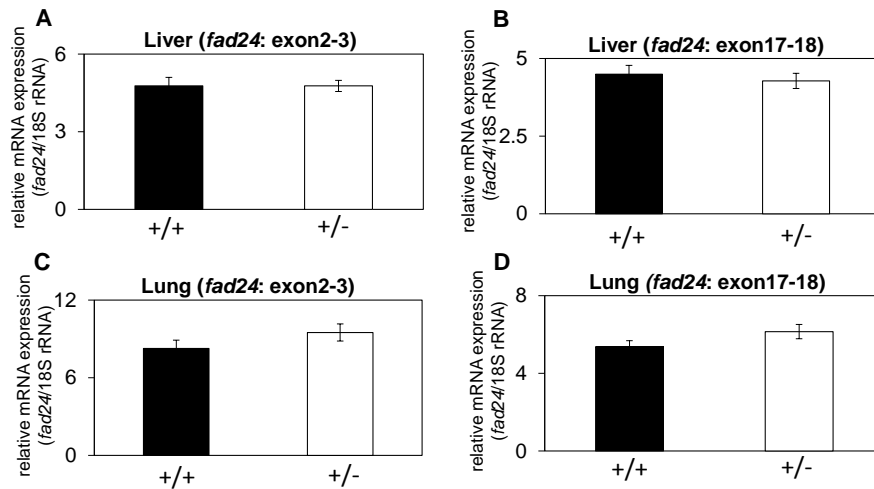


Fig. 6. The expression level of *fad24* mRNA in *fad24* heterozygous. The mRNA levels of *fad24* in liver (A, B) and lung (C, D) were determined using primers Mm00457924_m1 (A, C) or MAK143 and MAK144 (B, D). The expression level of each gene was normalized with 18S rRNA expression. Bars indicate standard error (n = 4).

(1-4) *fad24* ホモ欠損マウスの樹立

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

fad24 ヘテロ欠損マウス (#35F および #53B 系統の F2 世代)

フェザー滅菌カミソリ替え刃 (フェザー)

tail prep buffer : 0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl, pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS、
500 µg/ml Proteinase-K (PCR grade, Roche)

phenol/CIAA : phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

1-2 実験方法

◇ マウスのゲノム DNA の調製

第一章 第一節 (1-2) に準じた。

◇ PCR による遺伝子型の決定

第一章 第一節 (1-3) に準じた。

(2) 実験結果

第一章 第一節 (1-2) で得られた F1 世代の *fad24* ヘテロ欠損マウス同士を交配し、離乳期である 3 週齢において、生まれた仔の遺伝子型を決定した。2 系統 102 匹について遺

伝子型を決定した結果、野生型および *fad24* ヘテロ欠損マウスは 1 : 2 の比率で生まれてきたが、*fad24* ホモ欠損マウスは存在しなかった (Table 1)。

Table 1. Genotypes of 3-weeks-old pups from *fad24* heterozygous intercrosses.

	No. of mice with genotype		
	+/+	+/-	-/-
male	18	28	0
female	16	40	0
total	34	68	0

第二節 *fad24* 欠損胚が死亡する発生ステージの検討

前節の検討により、*fad24* ホモ欠損マウスは胎生致死である可能性が示唆された。そこで次に、*fad24* ホモ欠損マウスが胎生期のどの段階で死亡するのか明らかにするために、*fad24* ヘテロ欠損マウスを交配し、胎生 13.5 日齢および 9.5 日齢の胎児を解析した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

fad24 ヘテロ欠損マウス (#35F および #53B 系統の F2 世代)

フェザー滅菌カミソリ替え刃 (フェザー)

tail prep buffer : 0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl, pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS、
500 µg/ml Proteinase-K (PCR grade, Roche)

phenol/CIAA : phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

1-2 実験方法

◇ マウスのゲノム DNA の調製

第一章 第一節 (1-2) に準じた。

◇ 胎生 13.5 日齢胎児のゲノム DNA の調製

fad24 ヘテロ欠損雌性マウスを *fad24* 雄性マウスと一晩メイティングし、交配時から交配 13.5 日目にかけて 5 g 以上の体重増加があったマウスを妊娠したと判断し、実験に用いた。胎児の尾を解剖用ハサミで約 3 mm 切断し、tail prep buffer 200 µl を添加して、55 °C で一晩インキュベートした。これをフェノール/CIAA 200 µl で 2 回処理した。得られた上清を滅菌水で 64 倍に希釈してジェノタイピングに使用した。

◇ 胎生 9.5 日齢胎児のゲノム DNA の調製

fad24 ヘテロ欠損雌性マウスを *fad24* 雄性マウスと一晩メイティングし、交配時から交配 9.5 日目にかけて 3 g 以上の体重増加があったマウスを妊娠したと判断し、実験に用いた。胎児の尾を解剖用ピンセットで切断し、tail prep buffer 50 µl を添加して、55 °C で一晩インキュベートした。翌日、Proteinase-K を添加していない tail prep buffer をさらに 150 µl 加えてよく混合し、室温で数十分インキュベートした。これをフェノール/CIAA 200 µl で 2 回処理した。得られた上清を滅菌水で 64 倍に希釈してジェノタイピングに使用した。

◇ PCR による遺伝子型の決定

第一章 第一節 (1-3) に準じた。

(2) 実験結果

fad24 ホモ欠損マウスが胎生期のどの段階で死亡するか明らかにするために、*fad24* ヘテロ欠損マウス同士を交配し、胎生 13.5 日齢および 9.5 日齢の胎児からゲノムを採取した。胎生 13.5 日齢の胎児 27 匹、胎生 9.5 日齢の胎児 29 匹の遺伝子型を決定したが、その中には *fad24* ホモ欠損胎児はいなかった (Table 2)。

以上の結果から、*fad24* ホモ欠損マウスは胎生 9.5 日齢以前に死亡することがわかった。

Table 2. Genotypes of progeny aged E9.5 and E13.5 after birth from *fad24* heterozygote intercrosses were determined by PCR.

age	No. of mice with genotype		
	+/+	+/-	-/-
E9.5	7	22	0
E13.5	8	19	0

第三節 *fad24* 欠損が初期胚発生に与える影響の解析

(3-1) 胎生 3.5 日齢における *fad24* ホモ欠損胚の解析

fad24 欠損マウスが胎生期 9.5 日齢以前のどの時期に死亡するかを明らかにするために、着床前の段階である胎生 3.5 日齢の胚を採取し、その状態を観察するとともに、ゲノムを抽出して遺伝子型を決定した。

(1) 実験材料および実験方法

1-1 実験材料

fad24 ヘテロ欠損マウス (#35F および#53B 系統の F2 世代)

動物専用セロトロピン (あすか製薬)

動物専用ゴナドトロピン (あすか製薬)

PBS (-): 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄

blastocyst prep buffer: 0.05 % SDS, 0.035 N NaOH

phenol/CIAA: phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

M2 培地 (SIGMA)

Penicillin G potassium salt (SIGMA)

Streptomycin sulfate salt (和光純薬)

1 ml シリンジ (Terumo)

26G, 27 G 注射針 (Terumo)

Drummond Scientific Company Calibrated Pipet 100 μ l (フナコシ)

フェザー滅菌カミソリ替え刃 (フェザー)

1-2 実験方法

◇ 雌性マウスの過排卵誘起および胎生 3.5 日齢胚の採取

胎生 3.5 日齢の胚採取は、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験研究教育センターにて行った。

9 週齢の *fad24* ヘテロ欠損雌性マウスに、PBS (-) で 50 IU/ml に調製したセロトロピン (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 0.15 ml を腹腔内投与した。48 時間後、この雌性マウスに、PBS (-) で 50 IU/ml に調製したゴナドトロピン (human choriogonadotropin, hCG) 0.15 ml を腹腔内投与し、*fad24* ヘテロ欠損雄性マウスと同居させた。同居させた翌日を胎生 0.5 日目として、胎生 3.5 日目で子宮を摘出して M2 培地 0.2 ml で子宮灌流を行い、胎生 3.5 日齢胚を採取した (Fig. 7)。

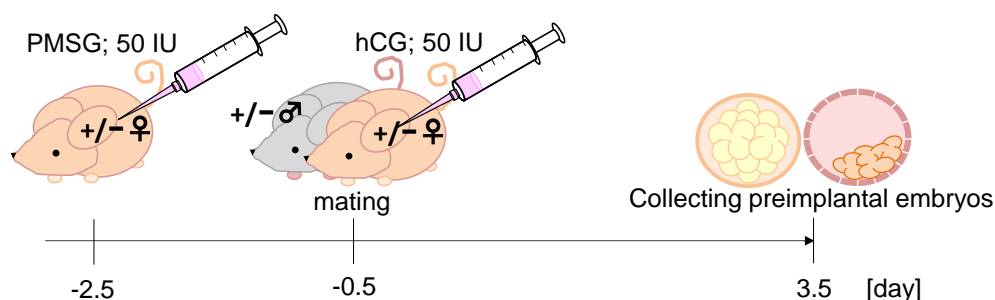


Fig. 7 The method of collecting preimplantation embryos.

Fad24 heterozygous female mice were injected with 5 IU of PMSG and after 48 h with 5 IU of hCG and crossed with heterozygous male mice.

◇ 胎生 3.5 日齢胚のゲノム DNA の調製

Blastocyst prep buffer 3 μ l に、マウスパスツールを用いて胚を一つずつ入れ、95 °C,

5 min インキュベートした。この溶液を滅菌水で 4 倍に希釈し、ジェノタイピングに使用した。

◇ PCR による遺伝子型の決定

第一章 第一節 (1-3) に準じた。

(2) 実験結果

fad24 ヘテロ欠損雌性マウスに過排卵処理を行い、胎生 3.5 日齢の胚を子宮灌流により採取した。得られた初期胚 48 個の中には *fad24* ホモ欠損胚が存在しており、野生型：ヘテロ欠損：ホモ欠損の比率は約 1：2：1 であった (Table 3)。この結果より、*fad24* ホモ欠損胚は着床前の初期胚の段階では存在していることがわかった。

次に、得られた胚を発生ステージで区分した。胎生 3.5 日齢の胚は通常、胚盤胞の状態が存在する (25)。野生型およびヘテロ欠損胚の大部分は胚盤胞であった。一方、ホモ欠損胚は桑実胚よりも若いステージのものが多く、胚盤胞の状態の胚はひとつもなかった (Table 3)。したがって、*fad24* ホモ欠損胚は桑実胚から胚盤胞へと発生するステージで発生異常を起こす可能性が示唆された。

Table 3. Appearance of embryos from intercrosses of *fad24* heterozygous littermates recovered at E3.5.

	+/+	+/-	-/-	total
8 cells	0	1	3	4
> 8 cells ^a	0	4	3	7
morula	2	8	5	15
blastocyst	8	14	0	22
total	10	27	11	48

The embryos were divided into four categories according to their appearance.

^aembryos having more than 8 blastomeres.

(3-2) 体外受精により得た *fad24* ホモ欠損胚の解析

マウス胎内から胚を採取する方法では、発生過程における胚の様子を詳細に解析することは難しい。そこで、受精卵から胚盤胞までの胚発生の様子を観察するために、*fad24* ヘテロ欠損マウスの精子および卵子を用いて体外受精を行い、得られた受精卵を *in vitro* で培養した。胚は受精後 2 日目までドロップ培地中で培養し、8 細胞まで発生させた後、96 well プレートでさらに 2 日間個別培養し、発生の様子を顕微鏡で観察した。

(1) 実験材料および実験方法

1-1 実験材料

fad24 ヘテロ欠損マウス

動物専用セロトロピン (あすか製薬)

動物専用ゴナドトロピン (あすか製薬)

PBS (-) : 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄

blastocyst prep buffer : 0.05 % SDS, 0.035 N NaOH

マウス用 HTF (アークリソース)

マウス用 KSOM (アークリソース)

軽パラフィンミネラルオイル (Sigma)

1 ml シリンジ (Terumo)

26G, 27 G 注射針 (Terumo)

Drummond Scientific Company Calibrated Pipet 100 μ l (フナコシ)

培養ディッシュ (BD FALCON)

1-2 実験方法

◇ 雌性マウスの過排卵誘起

8 週齢の *fad24* ヘテロ欠損雌性マウスに、PBS (-) で 50 IU/ml に調製した PMSG 0.15 ml を腹腔内投与した。48 時間後、この雌性マウスに、PBS (-) で 50 IU/ml に調製した hCG 0.15 ml を腹腔内投与した。hCG 投与後、約 13 時間経過した雌性マウスをのちの実験に使用した (Fig. 8)。

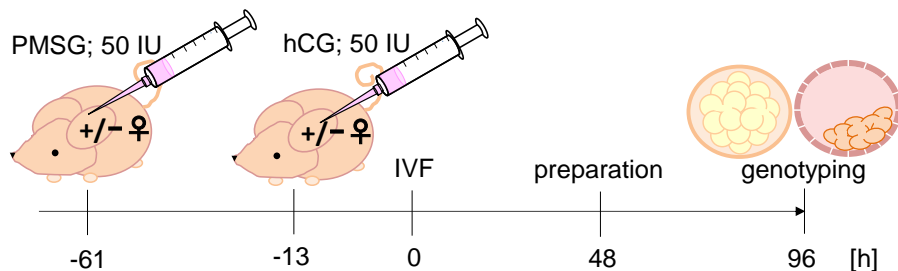


Fig. 8 The method of collecting oocytes.

Fad24 heterozygous female mice were injected with 5 IU of PMSG and after 48 h with 5 IU of hCG. The oocytes were collected about 13 h after hCG injection.

◇ 体外受精 (in vitro fertilization, IVF) および受精卵の培養

体外受精および受精卵の培養は、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験研究教育センターにて行った。

HTF 培地は、使用する前日に① 精子用 ; 100 μ l, ② 未受精卵用 ; 200 μ l を培養用ディッシュに添加して微小滴培地を作製し、ミネラルオイルで覆って 5 % CO₂ で飽和さ

せた。また、KSOM 培地は、使用する 6 時間前に約 30 μ l の微小滴培地 7 つを培養ディッシュに作製し、ミネラルオイルで覆って 5 % CO₂ で飽和させた。

雌性マウスに hCG を投与した約 12 時間後に、約 7 カ月齢の *fad24* ヘテロ欠損雄性マウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、精巣を採取した。HTF 培地内で、採取した精子を約 1 時間前培養した。次に、過排卵を誘起した雌性マウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、卵巣を採取した。卵管膨大部をオイル内で注射針により切り裂き、中の未受精卵を HTF 培地に誘導した。ここに、前培養した精子を 4 μ l 入れて媒精した (37 °C, 5 % CO₂)。

約 6 時間の媒精後、卵を HTF 培地から KSOM 培地に移し、数個の小滴を使って卵を洗浄した。前核が生じた受精卵と、未受精卵とを異なる微小滴培地に分け、37 °C, 5 % CO₂ 環境下で 2 日間培養した。受精卵は、毎朝、前日に 5 % CO₂ で飽和させた新鮮な KSOM 微小滴培地に移し、数個の小滴を使って洗浄後、新しい培地内で培養を行った。

人工授精 2 日後に、8 細胞まで発生した胚を前日に 5 % CO₂ で飽和させた新鮮な KSOM 培地で満たした 96 well プレートに一つずつ移し、さらに 2 日間培養を行った。半日ごと、胚の様子を顕微鏡下で観察した。その後、肺からゲノムを抽出し、遺伝子型を決定した。

◇ 胚からのゲノム抽出

ゲノム溶液にミネラルオイルが混入するのを防ぐために、胚をミネラルオイルで覆っていない KSOM 培地に移した。Blastocyst prep buffer 3 μ l に、マウスパスツールを用いて胚の一つずつ入れ、95 °C, 5 min インキュベートした。この溶液を滅菌水で 4 倍に希釈し、ジェノタイピングに使用した。

◇ PCR による遺伝子型の決定

第一章 第一節 (1-3) に準じた。

(2) 実験結果

得られた 27 個の胚のうち 20 個は、分離した翌日には割球同士が接着した桑実胚、さらにその翌日には大きな卵割腔と内部細胞塊を持つ胚盤胞へと発生し、正常に発生を続けた (Fig. 9A, a-d)。残り 7 個の胚は、桑実胚までは他の胚と大差なく発生したが、その後フラグメンテーションを起こし、胚盤胞にはならなかった (Fig. 9A, e-h)。遺伝子型を決定した結果、*fad24* ホモ欠損胚は全てが桑実胚から発生異常を起こし、胚盤胞になれた胚は一つもなかったことがわかった (Fig. 9B)。以上の結果より、*fad24* は胚盤胞形成に必須であることが明らかとなった。

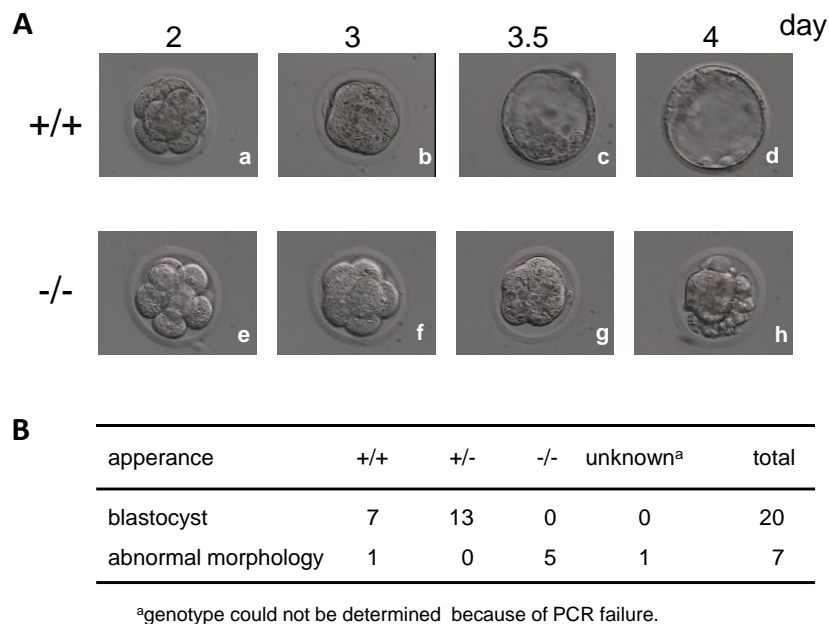


Fig. 9. *fad24* deficiency results in early embryonic lethality. (A) Pre-implantation development of *fad24* deficient embryos from the 8-cell to the blastocyst stage. Embryos were obtained from heterozygous IVF at 2-days cultivation, and cultured *in vitro* for 2 more days. The number shows the day after IVF. (B) Genotypes of 27 morulae that developed into blastocysts or exhibited abnormal morphology at day 4 after IVF were determined by PCR.

第四節 *fad24* 欠損が桑実胚の細胞数に与える影響

胚盤胞に発生できず死亡する遺伝子改変マウスの中には、桑実胚の時点ですでに異常を呈しているものが報告されている (26)。*fad24* は細胞増殖を正に制御する因子であることから、*fad24* ホモ欠損胚は胚を構成する細胞数に異常が生じているのではないかと考えられた。そこで、*fad24* ホモ欠損胚が起こす発生異常についてより詳細に明らかにするために、DNA に結合する色素 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて桑実胚を染色し、核を観察した。

(1) 実験材料および実験方法

1-1 実験材料

fad24 ヘテロ欠損マウス

動物専用セロトロピン (あすか製薬)

動物専用ゴナドトロピン (あすか製薬)

PBS (-): 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄

blastocyst prep buffer: 0.05 % SDS, 0.035 N NaOH

マウス用 HTF (アークリソース)
マウス用 KSOM (アークリソース)
軽パラフィンミネラルオイル (Sigma)
1 ml シリンジ (Terumo)
26G, 27 G 注射針 (Terumo)
Drummond Scientific Company Calibrated Pipet 100 μ l (フナコシ)
培養ディッシュ (BD FALCON)
4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (-)
0.2% Triton X-100 in PBS (-)
4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

1-2 実験方法

◇ 雌性マウスの過排卵誘起

第一章 第三節 (3-2) に準じた。

◇ 体外受精 (IVF) および受精卵の培養

第一章 第三節 (3-2) に準じた。得られた受精卵は、KSOM 微小滴培地で 3 日間培養し、桑実胚まで発生させた。

◇ 桑実胚の DAPI 染色

IVF 後、桑実胚まで発生させた胚を PBS (-) で洗浄し、4% PFA in PBS (-) で 4 °C, 20 分間固定処理した。固定した胚は 0.2% Triton X-100 in PBS (-) で室温、10 分間透過処理した後、3 回洗浄し、1 μ g/mL DAPI in PBS (-) 溶液につけて室温、10 分間染色した。染色した胚は、共焦点蛍光顕微鏡 (LSM5 PASCAL, Carl Zeiss) を用いて観察し、AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) ソフトウェアを用いて 3D デコンボリューション処理を行った。

◇ 胚からのゲノム抽出

第一章 第三節 (3-1) に準じた。

◇ PCR による遺伝子型の決定

第一章 第一節 (1-3) に準じた。

(2) 実験結果

桑実胚期において、野生型胚と *fad24* ホモ欠損胚で胚の形状に大きな違いは見られなかった (Fig. 10A, phase contrast)。一方、ホモ欠損胚は、DAPI で染色された核の数が野生

型と比較して少なかった (Fig. 10A, DAPI)。各胚における核の数を定量した結果、ホモ欠損胚では野生型胚と比較して有意に核の数が少ないことがわかった (Fig. 10B)。したがって、*fad24* ホモ欠損桑実胚は、外見上は正常な桑実胚のようだが、この時点ですでに胚を構成する細胞の数が少ないという異常を呈していることが明らかとなった。

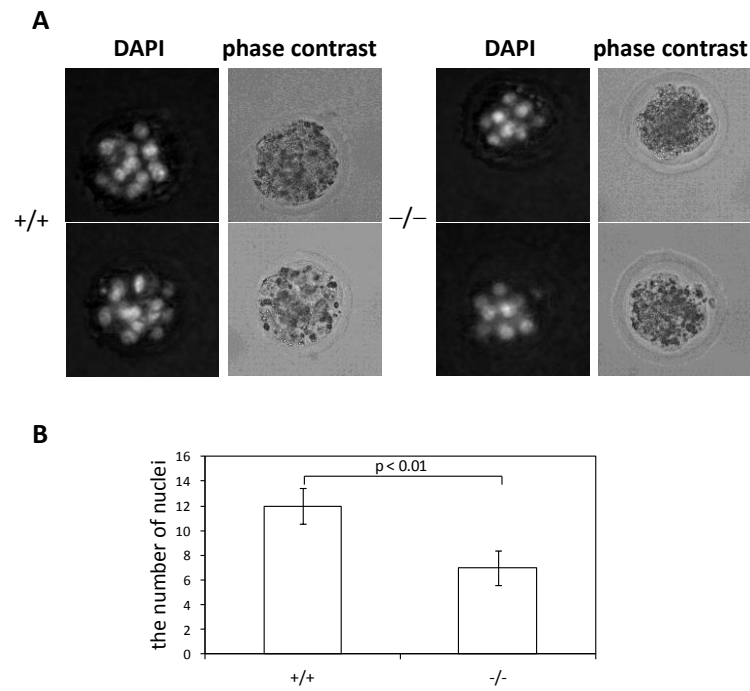


Fig. 10. Analysis of preimplantation embryos from *fad24*^{+/-} intercrosses. (A) Nuclear staining with DAPI of *in vitro*-cultured embryos 3-days after IVF. The phase contrast pictures and DAPI-stained pictures are shown in right- and left side in each panel, respectively. (B) A series of z-plan images was stacked and analyzed by Axiovision (Carl Zeiss) to quantify the number of nuclei in *fad24*^{+/+} and *fad24*^{-/-} embryos. P-value was determined by a t-test.

第五節 考察および小括

(1) 考察

fad24 欠損マウスを用いた解析により、*fad24* ホモ欠損マウスは胎生 9.5 日齢以前に胎生致死となること、*fad24* ホモ欠損胚は桑実胚期において野生型胚よりも核の数が少なく、*in vitro* で培養すると胚盤胞まで発生できずに死亡することを明らかとした。核の数が少なかったことから、ホモ欠損桑実胚は野生型桑実胚と比較して、胚を構成する細胞数が少なかったと考えられる。本研究により明らかとなった *fad24* の役割について、Fig. 11 にまとめた。

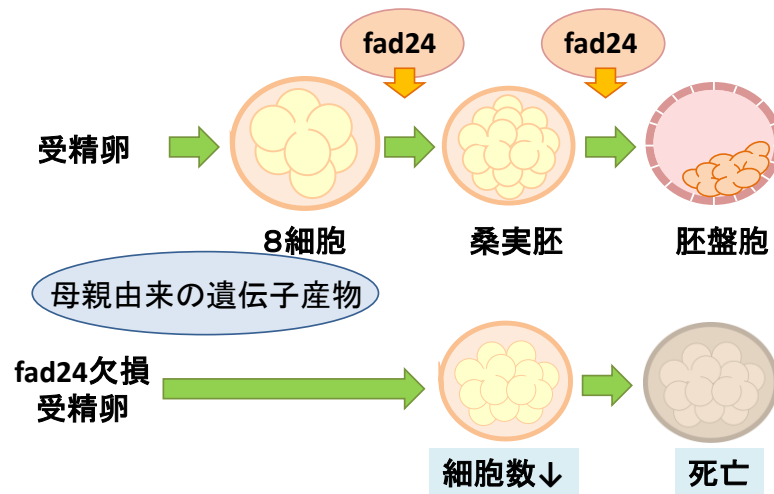


Fig. 11. Model of *fad24* function during pre-implantation development.

受精卵は、卵割により 2 細胞、4 細胞、8 細胞……と発生した後、盛んに細胞増殖を起こして桑実胚、続いて胚盤胞となり、透明帯から離脱して着床する (25)。胎生 3.5 日齢において、胚盤胞まで発生していた *fad24* ホモ欠損胚は一つもなかった (Table 3)。さらに、体外受精で得た受精卵を *in vitro* で培養した結果、*fad24* ホモ欠損胚は桑実胚期において野生型胚よりも細胞数が少ないという異常を呈し、胚盤胞まで発生できずに死亡した (Figs. 9, 10)。桑実胚から胚盤胞にかけての発生過程では、embryonic stem (ES) 細胞を始めとした多様な細胞が新たに生じることが知られており、*fad24* はそのような胚盤胞特有の細胞の形成に関与しているかもしれない。一方で、桑実胚期において既に細胞数が少なかったことから、*fad24* は受精から桑実胚にかけての細胞増殖に関与している可能性が考えられる。今後、*fad24* 欠損により数が減少している細胞種を同定し、*fad24* が機能する発生ステージを明らかとすることが必要である。また、卵子には母親由来の mRNA およびタンパク質が蓄積されており、受精卵から 8 細胞期頃まで残存していることが知られている (27)。本研究で用いた *fad24* ホモ欠損胚においても、桑実胚までの胚発生過程において母親由来の *fad24* が

働いていた可能性が十分に考えられる。母親由来の *fad24* が初期胚発生に関与するか否か解析するために、受精卵に蓄積されている母親由来遺伝子産物中の *fad24* の存在状況を検討する必要がある。さらに、本研究では *in vitro* でホモ欠損胚の発生過程を観察したため、*in vivo* においてホモ欠損胚が発生を停止する正確なステージも不明である。*fad24* が機能する発生ステージをより詳細に明らかにするためには、今後、*fad24* ホモ欠損胚が起こす発生異常について、マウス胎内から採取した胚についても検討することが重要である。

当研究室ではこれまでに、*fad24* が DNA 複製を介して細胞増殖を正に制御することを明らかにしている (20, 22)。また、*fad24* ホモ欠損桑実胚は核の数が少なかったことから、細胞増殖に異常を生じていたと考えられる (Fig. 10)。初期胚発生において、DNA 複製の制御は非常に重要である。たとえば、DNA 複製の開始と維持に寄与する *minichromosome maintenance 10 (Mcm10)* を欠損した胚は、桑実胚から胚盤胞に発生できず死亡する (26)。したがって、*fad24* は初期胚発生過程においても、DNA 複製の制御を介して細胞増殖に寄与する可能性がある。

酵母 *Noc3p* は、DNA 複製に加えて rRNA 生合成にも重要な役割を担っていることが知られているため (19)、*fad24* も rRNA 生合成に寄与している可能性がある。初期胚発生においては、rRNA 生合成が必須であることが知られている。たとえば、RNA polymerase 1-2 (*Rpo1-2*) を欠損すると、桑実胚から胚盤胞へ発生することができなくなることが報告されている (28)。しかしながら、*fad24* が rRNA 生合成に寄与しているか否か、未だ不明であり、rRNA 生合成における *fad24* の役割についても今後検討が必要である。

FAD24 は HBO1 を DNA 複製開始点にリクルートすることにより DNA 複製を正に制御することがわかっている (20)。しかし、*hbo1* 欠損マウスは胎生 10.5 日齢まで発生することが報告されており (29)、FAD24 は初期胚発生において HBO1 非依存的に機能する可能性がある。マウスから胚を採取する方法では、一匹のマウスから得られる胚の数が少ないため、十分量の RNA やタンパク質を調製することは困難である。より豊富に卵が得られるカエル等の生物を用いて、初期胚発生過程における *fad24* の役割を検討していくことが重要と思われる。また、初期胚発生過程において *fad24* が機能する分子メカニズムを明らかにするために、*fad24* 欠損受精卵や初期胚を用いてマイクロアレイ解析等を行い、*fad24* 欠損が影響を与える因子群についても解析を行う必要がある。

(2) 小括

1. エキソン 6 から 9 の一部を欠損した *fad24* ヘテロ欠損マウスを樹立した。
2. *fad24* ホモ欠損マウスは胎生致死であった。
3. 胎生 3.5 日齢において、胚盤胞の状態の *fad24* ホモ欠損胚はなかった。

4. *In vitro* 培養実験において、*fad24* ホモ欠損胚は正常な胚盤胞に発生できなかった。
5. *fad24* ホモ欠損桑実胚は野生型と比較して核の数が少なかった。

第二章 *fad24* が骨格筋再生において担う機能の解析

第一節 ヘビ毒 cardiotoxin (CTX) による *fad24*, *hbo1* の発現変化

骨格筋は再生能に優れた組織であり、運動等で傷ついた組織を修復する機能を有している (30, 31)。筋再生においては、筋芽細胞の増殖や筋分化が重要である。*fad24* は脂肪細胞分化や細胞増殖を正に制御していることから、骨格筋再生においても細胞増殖や筋分化に関与している可能性が考えられた。そこで、骨格筋における *fad24* の役割を明らかにするため、筋再生に着目した検討を行った。

骨格筋再生モデルには、ヘビ毒 cardiotoxin (CTX) が広く用いられている (32, 33)。マウス骨格筋に CTX を投与すると、筋細胞が破壊されるとともに、筋組織幹細胞サテライト細胞が活性化し、新しい筋線維へと分化して組織を再生する。まず、CTX 投与による *fad24* および *hbo1* の発現変化を検討した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

C57BL/6J マウス (8 週齢の雄性マウス、SLC)

ソムノペンチル (協立製薬)

cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* (Sigma)

Tissue-Tek OCT compound (サクラファインテックジャパン)

ヘマトキシリン溶液

エオジン溶液

PBS (-): 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄

4 %パラホルムアルデヒド (ナカライテスク)

TriPure (Roche)

ReverTra Ace α - (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール (ナカライテスク)

1 ml シリンジ (Terumo)

27 G 注射針 (Terumo)

Cryostat (LEICA)

シランコートスライドガラス (MATSUNAMI)

カバーガラス (MATSUNAMI)

1-2 実験方法

◇ cardiotoxin (CTX) 筋肉内注射による筋傷害実験

野生型マウスに、滅菌水で 6.4 mg/ml に希釈したソムノペンチルを 60 mg/kg となるように腹腔内投与し、全身麻酔を施した。麻酔下、前脛骨筋に 20 μ M の CTX 50 μ l を筋肉内注射した。注射後、サンプリングまで自由摂食環境下で飼育した。

◇ 新鮮凍結切片の作製と観察

CTX 投与したマウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、前脛骨筋を摘出した。OCT compound の中に前脛骨筋を包埋し、ドライアイスで凍結した。筋線維に対して垂直になるよう、厚みを 20 μ m に設定した Cryostat で標本を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色して BIO ZERO (KEYENCE) で観察した。

【ヘマトキシリン・エオジン染色】

スライドガラスに貼りつけた薄切切片を 4 %パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、軽く流水水洗した後、ヘマトキシリン溶液に約 5 分つけて染色した。流水水洗後、エオジン溶液に軽くつけて染色し、70, 80, 90, 100%エタノールに順につけて脱水した。脱水後、キシレンで透徹して封入した。

◇ Total RNA の調製

CTX 投与したマウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、前脛骨筋を摘出して TriPure でホモジナイズした。クロロホルム抽出、2-プロパノール沈殿後、得られた RNA を DEPC-d.d.w.に溶解した。

◇ cDNA の調製

逆転写反応は ReverTra Ace α - を用いて、以下の条件により行った。

〈反応液組成〉

Total RNA (0.25 μ g/ μ l)	4.00 μ l
RNase free H ₂ O	8.60 μ l
5 x RT buffer	4.00 μ l
dNTP mixture	2.00 μ l
Random primer	1.00 μ l
RNase inhibitor	0.25 μ l
ReverTra Ace	0.15 μ l
<hr/>	
	20.00 μ l

〈反応条件〉

30 °C 10 min、42 °C 20 min、99 °C 5 min、4 °C 5 min

◇ 定量 PCR

ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) の条件に準じて行った。*fad24*, *hbo1*, *myoD* および 18S rRNA の各プライマーならびにプローブセットは Applied Biosystems より購入した。

〈プライマーおよびプローブ〉

fad24: Mm00457924_m1

hbo1: Mm00624391_m1

myoD: Mm00440387_m1

18S rRNA のプライマーおよびプローブのセット : 4308329

(2) 実験結果

野生型 C57BL/6J マウスの骨格筋に CTX を投与し、投与後 1, 3, 7, 14 日目の新鮮凍結切片を作製するとともに、投与後 0.5, 1, 3, 7, 14 日目に total RNA を回収した。まず、作製した切片を顕微鏡下で観察した (Fig. 12A)。その結果、これまでに報告されているとおり、CTX 投与 1 日後の組織では、筋線維が破壊され、線維間に大きな隙間が生じている様子が観察された。また、投与後 3 日目の組織では、炎症性細胞と考えられる単核細胞が組織全体に見られた。投与後 7 日目の組織においては、破壊された筋線維が除去されて、核が中央に認められる新しい幼若な筋線維が生じていることが観察された。さらに、CTX 投与後 14 日目には、幼若な筋線維が成長し、ほぼ筋組織が元通りに修復している様子が観察された。次に、筋再生マーカーである *myoD* の発現量をリアルタイム PCR で検討した結果、CTX 投与 0.5 日後および 3 日後において、*myoD* の発現が上昇していた (Fig. 12B)。これらの結果より、採取した骨格筋において、CTX 投与による筋組織の破壊および再生が起こっていると考えられた。そこで次に、この条件における *fad24* ならびに *hbo1* の発現変化をリアルタイム PCR で検討した。Fig. 12C および 12D に示すとおり、*fad24*, *hbo1* ともに CTX 投与後 0.5~1 日にかけて発現が上昇していた。

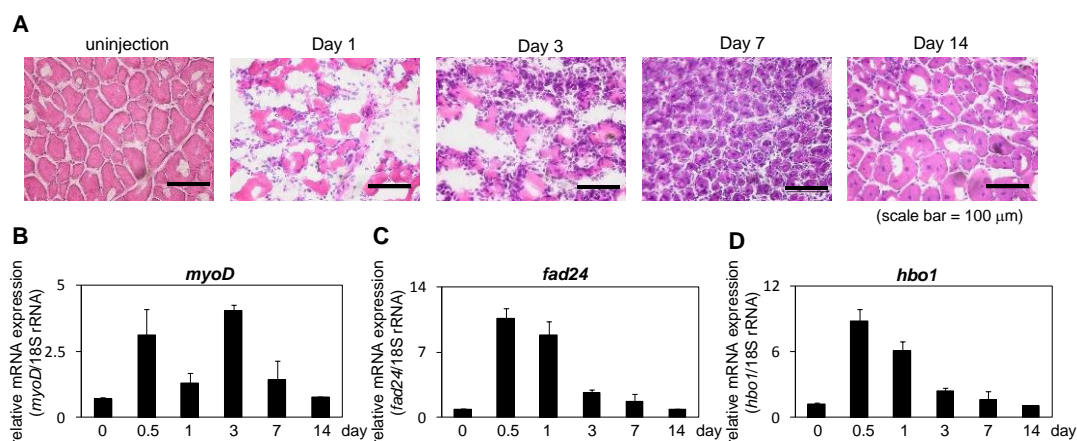


Fig. 12. Expression of *fad24* and *hbo1* is transiently induced in skeletal muscle regeneration in response to CTX injury. (A) Histological analysis of the TA muscles in skeletal muscle regeneration in response to CTX injury. Cryosections of the TA muscles at indicated days after CTX injections were stained with H&E. Bars = 100 μm. (B–D) The mRNA levels of *myoD* (B), *fad24* (C), and *hbo1* (D) were determined during skeletal muscle regeneration in response to CTX injury. The expression level of each gene was normalized with 18S rRNA expression. Bars indicate standard error (n = 3).

第二節 *fad24* が C2C12 細胞の筋分化に与える影響の解析

筋再生能には、筋組織幹細胞であるサテライト細胞が大きく寄与している (34)。成体においては、サテライト細胞は通常、増殖や分化を行わない静止した状態で筋線維間に存在しているが、傷害を感知すると活性化して細胞周期に再エントリーし、増殖、筋分化、融合を経て新しい筋線維を構成する。筋再生過程における *fad24* の役割を明らかにするため、まず、マウスサテライト細胞由来の株化筋芽細胞 C2C12 を用いて、*fad24* 発現抑制が筋分化に与える影響を検討した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

C2C12 (大日本住友製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

α-MEM (gibco)

Fetal bovine serum (FBS) (Biowest)

Nucleofector solution kit V (Lonza)

fad24 short hairpin (sh) RNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

Scramble shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

pmaxGFP (Amaxa)

TriPure (Roche)

ReverTra Ace -α- (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

SYBR premix EX Taq II (Takara Bio)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール (ナカライテスク)

基本培地 : DMEM, 10% FBS

分化誘導培地 : α -MEM, 1% FBS

1-2 実験方法

◇ C2C12 細胞の培養

基本培地を用いて、5% CO₂, 37 °C において培養した。

◇ プラスミドの調製

トランスフェクションに用いたプラスミドは、QIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて調製した。

◇ トランスフェクションおよび分化誘導

C2C12 細胞への遺伝子導入は、Nucleofector™ (Lonza) を用いて行った。メーカーは、2 μ g のプラスミドを導入するプロトコルを推奨している。当研究室において C2C12 細胞と同様にトランスフェクションの導入効率が低いマウス 3T3-L1 細胞に導入する場合、9 μ g を導入すると効率が上昇する結果を得ている。さらに、C2C12 細胞に GAPDH shRNA 発現プラスミドを 2, 5, 9 μ g 導入し、トランスフェクションの条件検討を行ったところ、導入プラスミド量 9 μ g の条件で最も高い発現抑制効果を示す結果を得ている。そこで、pmaxGFP (Amaxa) を 2 μ g または 9 μ g 導入し、プラスミドが導入された細胞数を GFP の蛍光で評価した。その結果、9 μ g の pmaxGFP を導入した細胞では、細胞間で GFP の発現量に差があるものの、70-80%の細胞で蛍光が観察された (Fig. 13A)。一方、2 μ g の pmaxGFP を導入した細胞では約 40%の細胞で蛍光が観察された (Fig. 13B)。これらの結果をもとに、プラスミドを 9 μ g 導入する条件で以下のトランスフェクションを行った。

C2C12 細胞を回収し、 1×10^6 個の細胞に shRNA 発現プラスミドを 9 μ g, Nucleofector Solution V (Lonza) を 100 μ L 加えた。専用キュベットにサンプルを移し、Nucleofector を用いて program : B-32 の条件で電気パルスをかけた後、細胞を 35 mm dish (BECTON DICKINSON) に 3.3×10^5 cells/dish になるように播種した。約 90% confluent に達するまで培養し、PBS (-) で洗浄して分化誘導培地に培地を交換した。1 日おきに分化誘導培地で培地を交換した。分化させた細胞は、顕微鏡 (Biozero, KEYENCE) で観察した。

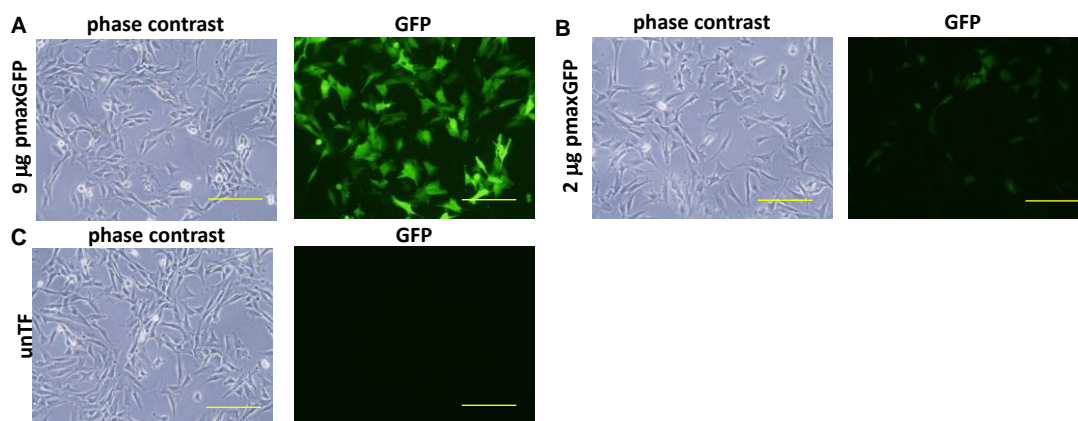


Fig. 13. The expression of GFP in C2C12 cells after nucleofection. C2C12 cells were transfected with 9 µg (A) or 2 µg (B) of pmaxGFP and incubated for 48 h. Untransfected cells were used as negative controls (C). Bars = 100 µm.

◇ Total RNA の調製

C2C12 細胞に TriPure 500 µL を加えてホモジナイズし、total RNA を回収した。RNA の精製方法は、第二章 第一節に準じた。

◇ cDNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ 定量 PCR

ABI PRISM 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた。*fad24* ならびに 18S rRNA の検討は、第二章 第一節に準じた。*myogenin* の検討は、SYBR premix EX Taq II (Takara Bio) の条件に準じて行った。プライマーは、以前に報告されたものと同じ配列を用いた (35)。

〈プライマー〉

myogenin : 5' primer (NAT118) 5'-gcaatgcactggagttcg-3'

3' primer (NAT119) 5'-acgatggacgtaagggagtg-3'

(2) 実験結果

shfad24 発現プラスミドを導入した C2C12 細胞を筋細胞へと分化させた。コントロールとして、*fad49* の標的配列をランダムに並び替えた scramble sh RNA 発現プラスミドを導入した細胞を用いた。*shfad24* 発現プラスミドの導入により、*fad24* の発現が有意に抑制された (Fig. 14A)。この条件下、分化誘導 6 日目において、*fad24* 発現抑制細胞とコントロール細胞で、筋管細胞の形成に明確な差異は見られなかった (Fig. 14B)。また、分化誘導 2.5

日目および6日目において、筋分化マーカーである *myogenin* の発現を検討したが、*fad24* 発現抑制による影響は見られなかった (Fig. 14C)。以上の結果より、*fad24* は C2C12 の筋分化に関与しないことが示された。

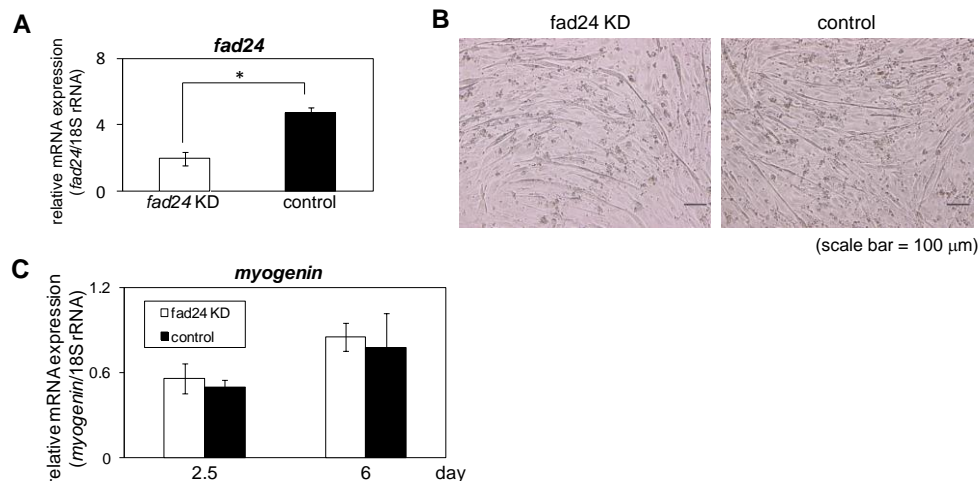


Fig. 14. Knockdown of *fad24* does not affect myogenic differentiation of C2C12 cells. (A) Knockdown efficiency of *fad24* in C2C12 myotubes. C2C12 cells were transfected with shRNA expression plasmid for *fad24* in growth medium. Scramble shRNA was used as a control. At 24-h post-transfection, the medium was replaced with differentiation medium and cultured for 6 days. The expression level of *fad24* was determined and normalized with 18S rRNA expression. Bars indicated standard deviation ($n = 3$, $*p < 0.01$). (B) Phase-contrast images of C2C12 cells cultured with differentiation medium for 6 days. Bars = 100 μ m. (C) Effect of *fad24* depletion on *myogenin* mRNA expression at 2.5 and 6 days after the induction of myogenic differentiation. The expression level of *myogenin* was normalized with 18S rRNA expression. Bars indicated standard deviation ($n = 3$).

第三節 *fad24* が C2C12 細胞の増殖停止/再開に与える影響の解析

(3-1) 血清刺激による増殖再開に *fad24* 発現抑制が与える影響の解析

骨格筋が破壊されると、サテライト細胞は 2 時間以内に活性化した後、傷害後 2-5 日目にかけて増殖し、その後、筋管細胞へと分化することが知られている (30, 31)。CTX 投与による *fad24* の発現上昇が投与後 12 時間という極めて早期であったことから、サテライト細胞の活性化に着目した検討を行った。

静止したサテライト細胞の活性化ならびに増殖における *fad24* の役割を検討するために、C2C12 細胞を血清飢餓状態にして増殖を停止させ、静止したサテライト細胞に近い状態にした。この C2C12 細胞の増殖再開における *fad24* の役割について検討した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

C2C12 (大日本住友製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

FBS (Biowest)

Nucleofector solution kit V (Lonza)

fad24 shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

Scramble shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

TriPure (Roche)

ReverTra Ace α - (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール (ナカライテスク)

基本培地 : DMEM, 10% FBS

無血清培地 : DMEM

1-2 実験方法

◇ C2C12 細胞の培養

第二章 第二節に準じた。

◇ プラスミドの調製

第二章 第二節に準じた。

◇ 血清飢餓/刺激 C2C12 細胞からの RNA 回収

C2C12 細胞を、 2×10^5 cells/dish になるように 6 cm ディッシュに播種し、翌日から無血清培地に培地を交換して 3 日間培養した。細胞が増殖を停止したことを顕微鏡下で確認した後、培地を基本培地に交換して血清刺激した。各時間帯で TriPure 500 μ L を加え、total RNA を回収した。

◇ トランスフェクションおよび血清飢餓/刺激

C2C12 細胞への遺伝子導入は、Nucleofector™ (Lonza) を用いて行った。細胞を回収し、 1×10^6 個の細胞に shRNA 発現プラスミドを 9 μ g, Nucleofector Solution V (Lonza) を 100 μ L 加えた。専用キュベットにサンプルを移し、Nucleofector を用いて program : B-32 の条件で電気パルスをかけた後、細胞を 35 mm dish (BECTON DICKINSON) に 9.0×10^4 cells/dish になるように播種した。翌日から無血清培地に培地を交換し、3 日間培養した。細胞が増殖を停止したことを顕微鏡下で確認した後、培地を基本培地に交換して血清刺激した。

無血清培地で 3 日間培養した細胞から、TriPure 500 μ L を用いて total RNA を回収し、*fad24* 発現抑制効果を確認した。

◇ 細胞数の計測

35 mm ディッシュに培養した細胞を 0.25% Trypsin を用いて回収し、血球計数板を用いて細胞数を計測した。

◇ Total RNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ cDNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ 定量 PCR

第二章 第一節に準じた。

(2) 実験結果

myoD は、サテライト細胞や C2C12 が静止状態から脱する際に発現が上昇することが知られており、活性化マーカーとして用いられている (30, 31, 36)。そこでまず、血清刺激による *myoD* の発現変化をリアルタイム PCR で検討した。その結果、血清刺激 3 時間後に *myoD* の発現が上昇することがわかった (Fig. 15A)。

次に、*fad24* ならびに *hbo1* の発現変化を検討したところ、両因子とも血清刺激により発現が上昇していた (Figs. 15B, C)。したがって、*fad24*, *hbo1* も筋再生において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

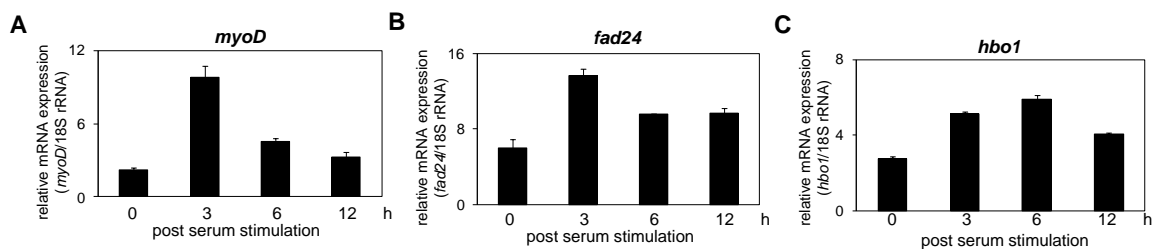


Fig. 15. The expression of *myoD*, *fad24* and *hbo1* is induced in in serum-activated C2C12. (A–C) Expression levels of *myoD* (A), *fad24* (B), and *hbo1* (C) after serum stimulation were determined. The expression level of each gene was normalized with 18S rRNA expression. Bars indicate standard deviation (n = 3).

そこで、血清刺激による増殖再開に *fad24* の発現抑制が与える影響を検討した。sh*fad24* 発現プラスミドの導入により、*fad24* の発現が有意に抑制された (Fig. 16A)。この細胞に血清刺激を行い、各時間帯における細胞数を検討した。コントロール細胞では 96 時間後に細胞数が約 27 倍に増加しており、正常に細胞増殖が再開していると考えられた (Fig. 16B)。一方、*fad24* 発現抑制細胞では、血清刺激後 48, 72, 96 時間において、コントロール細胞と

比較して有意に細胞の増加が阻害されていた。よって、*fad24* を発現抑制すると、血清刺激による増殖再開が阻害されることがわかった。

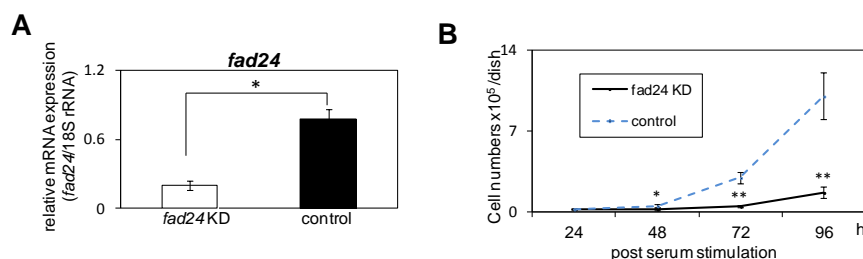


Fig. 16. Knockdown of *fad24* inhibits proliferation of C2C12 cells after serum-stimulation. (A) Knockdown efficiency of *fad24* in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were transfected with shRNA expression plasmid for *fad24* in growth medium. Scramble shRNA was used as a control. At 24-h post-transfection, cells were cultured in serum-free medium for 72 h. The expression level of *fad24* was determined and normalized with 18S rRNA expression. Bars indicated standard deviation (n = 3, **p* < 0.01). (B) Effect of *fad24* depletion on the proliferation of C2C12 cells. The number of cells was counted at indicated times after serum-stimulation. The asterisks indicate significant differences when compared with the values for control cells (***p* < 0.01, **p* < 0.05).

(3-2) 血清刺激による細胞周期再進入に *fad24* 発現抑制が与える影響の解析

血清刺激による増殖再開に *fad24* 発現抑制が与える影響について、より詳細に明らかにするため、血清刺激後の細胞周期再進入についてフローサイトメトリー法により解析した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

C2C12 (大日本住友製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

FBS (Biowest)

Nucleofector solution kit V (Lonza)

fad24 shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

Scramble shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

PBS (-): 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄

1% bovine serum albumin (BSA) in PBS (-)

Propidium iodide (PI) (Sigma)

100 μm セルストレーナー (Corning)

TriPure (Roche)

ReverTra Ace -α- (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール（ナカライテスク）

基本培地：DMEM, 10% FBS

無血清培地：DMEM

1-2 実験方法

◇C2C12 細胞の培養

第二章 第二節に準じた。

◇プラスミドの調製

第二章 第二節に準じた。

◇トランスフェクションおよび血清飢餓/刺激

第二章 第三節 (3-1) に準じた。

◇ フローサイトメトリー解析

細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、冷 70%エタノールで-20°C, 4 時間、固定処理した。PBS (-) で洗浄後、1% BSA in PBS (-) に懸濁し、200 µg/mL になるよう RNase A を加えて 37°C, 30 分間反応させた。この細胞を 100 µL の PI (10 µg/mL) に懸濁して染色し、100 µm セルストレーナーに通した後、BD FACSVerser (Becton Dickinson) で DNA 含量を測定した。

◇ Total RNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ cDNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ 定量 PCR

第二章 第一節に準じた。

(2) 実験結果

コントロール細胞では、無血清培地で培養することにより、90%以上の細胞が G0/G1 期へと移行した (Figs. 17A, B, 0 h)。この細胞を血清で刺激すると、16 時間後に S 期、20 時間後に G2/M 期の細胞が増加し、正常に細胞周期へ再進入していることが確認された。一方、*fad24* 発現抑制細胞は、血清刺激による S 期、G2/M 期への移行が著しく低下していた

(Figs. 17A, B, 16, 20 h)。S 期に存在する細胞数を定量した結果、*fad24* 発現抑制細胞では、血清刺激 16 時間後に S 期に存在する細胞数がコントロール細胞と比較して有意に少ないことがわかった (Fig. 17C)。以上の結果より、*fad24* を発現抑制すると、血清刺激による S 期再進入が抑制されることが明らかとなった。

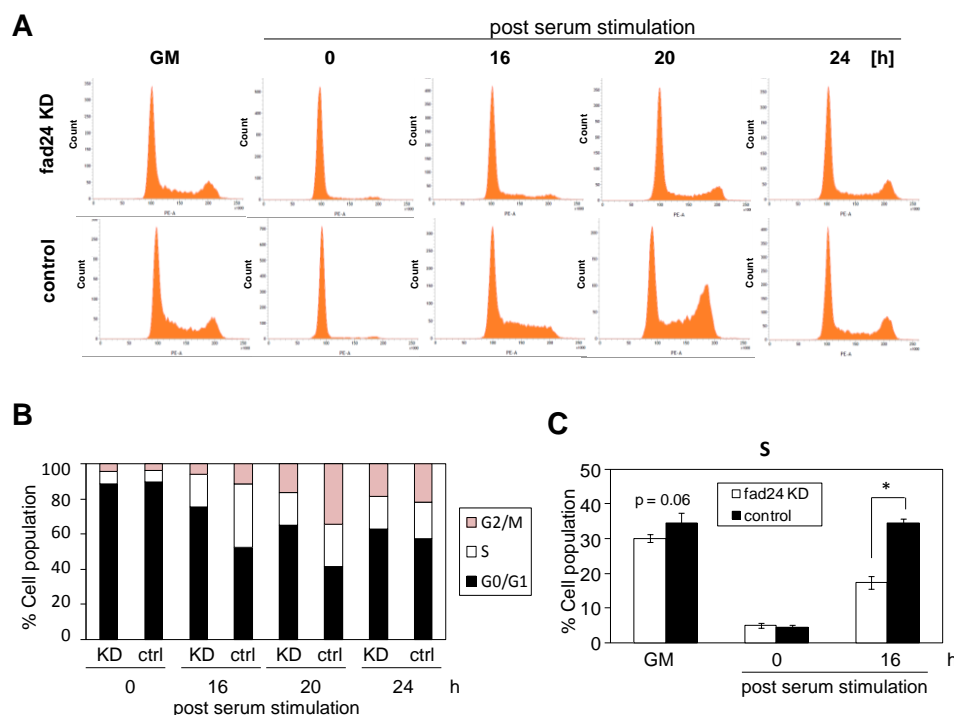


Fig. 17. Knockdown of *fad24* inhibits serum-induced S phase entry. (A–C) Effect of *fad24* depletion on S phase entry in C2C12 myoblasts. C2C12 cells transfected with shRNA expression plasmids were arrested in G0 phase by serum deprivation for 72 h and were then stimulated by incubation in DMEM containing 10% FBS. These cells were harvested at each point, and analyzed by flow cytometry after PI staining. GM represents the cells cultured in growth medium before serum deprivation. Representative histograms depicting cell cycle profiles (A), quantifications of the histograms (B), and the population of cells in the S phase (C) are shown. Bars indicate standard deviation (n = 3, **p* < 0.01).

第四節 細胞周期活性化抑制因子 p27^{Kip1} の発現に *fad24* 発現抑制が与える影響

前節の検討結果より、*fad24* 発現抑制が血清刺激による S 期再進入を阻害することがわかった。そこで次に、*fad24* が増殖再開に寄与する分子メカニズムを明らかにするために、C2C12 の増殖再開に重要な *myoD* ならびに p27^{Kip1} の発現に *fad24* 発現抑制が与える影響を検討した。

(1) 実験材料及び実験方法

1-1 実験材料

C2C12 (大日本住友製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

FBS (Biowest)

Nucleofector solution kit V (Lonza)

fad24 shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

Scramble shRNA 発現プラスミド (当研究室で構築済)

TriPure (Roche)

ReverTra Ace α (Roche)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

クロロホルム (ナカライテスク)

2-プロパノール (ナカライテスク)

RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 150 mM NaCl

transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol

TTBS: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1% Tween20

skim milk powder (wako)

Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)

基本培地 : DMEM, 10% FBS

無血清培地 : DMEM

1-2 実験方法

◇C2C12 細胞の培養

第二章 第二節に準じた。

◇プラスミドの調製

第二章 第二節に準じた。

◇トランスフェクションおよび血清飢餓/刺激

第二章 第三節 (3-1) に準じた。

◇ 血清飢餓/刺激 C2C12 細胞からの RNA 回収

第二章 第三節 (3-1) に準じた。

◇ Total RNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ cDNA の調製

第二章 第一節に準じた。

◇ 定量 PCR

第二章 第一節に準じた。

◇ 血清飢餓/刺激 C2C12 細胞の cell lysate の調製

PBS (-) で洗浄して細胞を回収し、RIPA buffer 20 μ L に懸濁して on ice, 20 分間静置した。この lysate を 4°C, 15,000 rpm, 30 分間遠心分離し、上清を Western Blotting 解析に用いた。

◇ Western Blotting 法

等量の cell lysate (3 μ g 相当) を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (13% gel) により分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に、transfer buffer 中で on ice, 100V, 2 時間転写した。転写膜は、3% skim milk in TTBS 中で室温、1 時間ブロッキングし、TTBS で 5 分間、3 回洗浄した後、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。次に、TTBS で 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体と室温で 2 時間反応させた。転写膜を TTBS で 5 分間、3 回洗浄し、enhanced chemiluminescence (ECL) system (GE Healthcare) を用いて目的のバンドを検出した。

一次抗体 : mouse anti mouse p27^{Kip1} monoclonal antibody (610241, BD Transduction Laboratories)

3% skim milk in TTBS で 5,000 倍に希釈して使用

mouse anti rabbit GAPDH monoclonal antibody (ACR001PS, Acris)

3% skim milk in TTBS で 2,000 倍に希釈して使用

二次抗体 : sheep ECL anti mouse IgG, horseradish peroxidase-linked species specific whole antibody (Amersham Bioscience)

TTBS で 10,000 倍に希釈して使用

(2) 実験結果

myoD は、サテライト細胞の活性化によって発現が上昇し、細胞周期再進入を促進することが知られている (36)。そこでまず、血清刺激による *myoD* の発現上昇に *fad24* 発現抑制が影響を与えるか否かについて検討を行った。その結果、*fad24* を発現抑制しても、血清刺激による *myoD* の発現に影響は見られないことがわかった (Fig. 18A)。

次に、細胞周期活性化抑制因子である p27^{Kip1} に着目した。p27^{Kip1} は、細胞周期の進行を促進する cyclin/cyclin-dependent kinase (CDK) 複合体の機能を阻害する cyclin/CDK inhibitor (CKI) の一つであり、静止期である G0 期から G1 期への移行を強力に阻害している (37, 38)。Fig. 18B に示すように、*fad24* を発現抑制しても、p27^{Kip1} mRNA の発現には有意な影響を与えなかった。一方、*fad24* 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比較して血清飢餓状態ならびに血清刺激 8 時間後の p27^{Kip1} のタンパク質レベルが有意に高いことが明らかとなった (Fig. 18C)。したがって、*fad24* 発現抑制細胞は、p27^{Kip1} の発現レベルがタンパク質レベルで高いことにより、S 期再進入が阻害されていると考えられた。

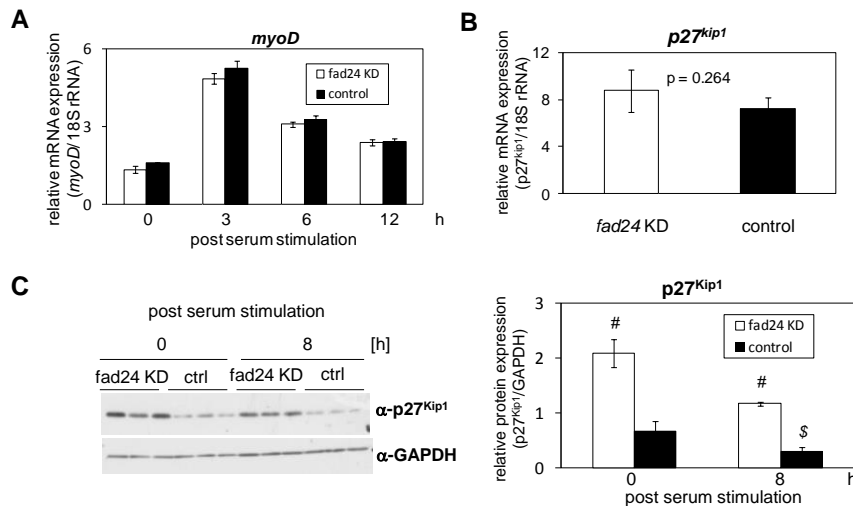


Fig. 18. Knockdown of *fad24* elevates the protein levels of p27^{Kip1} (A) Effect of *fad24* depletion on *myoD* mRNA expression. C2C12 cells were transfected with shRNA expression plasmid for *fad24* in growth medium. Scramble shRNA was used as a control. Cells were cultured in serum-free medium for 72 h at 24-h post-transfection, and were then stimulated by incubation in DMEM containing 10% FBS. The mRNA expression level of *myoD* at each point after serum stimulation was determined and normalized with 18S rRNA expression. Bars indicated standard deviation (n = 3). (B) Effect of *fad24* depletion on p27^{Kip1} mRNA expression. C2C12 cells were transfected with shRNA expression plasmid for *fad24* in growth medium. Scramble shRNA was used as a control. At 24-h post-transfection, cells were cultured in serum-free medium for 72 h. The mRNA expression level of p27^{Kip1} was determined and normalized with 18S rRNA expression. Bars indicated standard deviation (n = 3). (C) Effect of *fad24* depletion on the protein level of p27^{Kip1}. C2C12 cells transfected the shRNA expression plasmids were arrested in G0 phase by serum deprivation for 72 h and were then stimulated by incubation in DMEM containing 10% FBS. These cells were harvested, and analyzed by Western blotting (left panel). Intensities of signal from p27^{Kip1} were quantified by NIH-Image software, and normalized to GAPDH (right panel). Bars indicate standard deviation (n = 3). *p*-value was determined by one-way ANOVA with post-hoc Tukey–Kramer HSD test (#*p* < 0.01 vs. control cells, \$*p* < 0.05 vs. control cells at 0 h). Western blot shows the representative results in at least two independent experiments.

第五節 考察および小括

(1) 考察

骨格筋の再生過程に着目した検討により、*fad24* および *hbo1* が CTX 投与後 12 時間で発現上昇すること、*fad24* 発現抑制 C2C12 細胞では p27^{Kip1} タンパク質の発現レベルが高く、血清刺激による S 期への再進入が阻害されることを明らかにした。

骨格筋が傷害されると、筋線維間に存在する筋組織幹細胞サテライト細胞が活性化し、増殖、筋分化、融合を経て新しい筋細胞を構成し、組織を修復する (30, 31)。CTX 投与により発現が上昇したことから、*fad24* および *hbo1* は骨格筋再生に寄与していると推測された (Fig. 12)。また、株化筋芽細胞 C2C12 を用いた検討により、*fad24* は静止した C2C12 細胞の増殖再開を正に制御すること (Figs. 16, 17)、*fad24* 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比較して p27^{Kip1} タンパク質の発現レベルが高いことを明らかにした (Fig. 18C)。したがって、*fad24* は、p27^{Kip1} タンパク質の発現制御を介してサテライト細胞の活性化を正に制御していると考えられる。本研究により推察される骨格筋再生における *fad24* の役割について、Fig. 19 に示した。

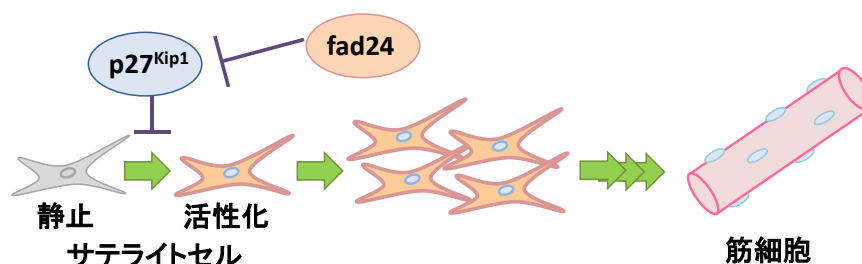


Fig. 19. Model of *fad24* function in muscle regeneration.

全身性の *fad24* 欠損マウスは胎生致死であったため、本研究では、*fad24* 欠損が骨格筋再生に与える影響を検討できていない。今後、骨格筋特異的に *fad24* を欠損したマウスを作製し、骨格筋再生への影響を検討する必要がある。

骨格筋再生の初期段階では、筋細胞が壊死を起こし、損傷部位に好中球やマクロファージといった免疫細胞が浸潤することが知られている (39)。サテライト細胞の活性化に加えて、免疫細胞の浸潤も骨格筋再生に重要である。たとえば、CC chemokine receptor 2 (CCR2) やそのリガンドである macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) を欠損したマウスでは、筋再生能が低下することが知られている (40, 41)。傷害部位に浸潤してきた好中球や M1 マクロファージは、壊死した筋細胞を除去するとともに、筋芽細胞の増殖、浸潤を促進する Th1 サイトカインを分泌し、筋再生に寄与する (31)。マクロファージは、CTX 投与 2 日後から筋組織に浸潤し始め、投与 3 日後にピークに達すると報告されている (31, 39)。Fig. 12 に示したとおり、CTX 投与による *fad24* の発現上昇はマクロファージ浸潤よりもず

っと早い時期であったことから、*fad24* がマクロファージの浸潤過程に寄与している可能性は低いと思われる。しかしながら、好中球はマクロファージより早期に浸潤してくることが報告されていることから (31, 39)、*fad24* は好中球においても発現し、機能している可能性が考えられる。さらに、壊死した筋細胞において *fad24* が発現している可能性も除外できない。今後、筋組織切片を用いた FAD24 の免疫染色実験や、筋組織の細胞分画実験により、*fad24* が発現する細胞を詳細に解析する必要がある。

本研究では、静止した C2C12 細胞の S 期再進入を、*fad24* が正に制御することを明らかにした (Figs. 16, 17)。脂肪細胞分化過程において、FAD24 は HBO1 と相互作用して mitotic clonal expansion (MCE) を正に制御する (20)。また、*fad24* は特に骨格筋において発現が高いが、その他の臓器においてもユビキタスに発現している (7)。これらの結果より、*fad24* は前駆脂肪細胞および筋芽細胞のみならず、様々な細胞種で細胞周期再進入に寄与している可能性がある。また、本研究により、*fad24* の相互作用因子である *hbo1* も、CTX 投与後に発現が上昇することがわかった (Fig. 12)。しかしながら、骨格筋再生における *hbo1* の役割は不明である。サテライト細胞の活性化においても、FAD24 と HBO1 が協調的に働いている可能性があり、今後詳細な解析が必要である。

p27^{Kip1} は静止した細胞で蓄積しており、G0 期から S 期への移行を強力に阻害している (38)。*fad24* 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比較して p27^{Kip1} の発現がタンパク質レベルで高いことから、それにより細胞周期への再進入が阻害されているのではないかと考えられた (Fig. 18C)。p27^{Kip1} タンパク質の発現量は、様々なメカニズムで制御されている。G0 期から G1 期へ移行する際には、核に局在していた p27^{Kip1} が細胞質に移動し、細胞質でユビキチン化を受けて分解されることが知られている (42)。核から細胞質への移動には、chromosomal region maintenance 1 (CRM1) 複合体が重要な役割を担っている (43, 44)。FAD24 は核小体ならびに核の微小構造に局在していることから (7)、FAD24 は核において p27^{Kip1} と複合体を形成し、核排出に関与している可能性がある。また、リン酸化により p27^{Kip1} タンパク質の局在や安定性が影響を受けることも知られている (45)。そのため、*fad24* が核において p27^{Kip1} のリン酸化を制御している可能性も考えられる。p27^{Kip1} の局在や翻訳後修飾における *fad24* の関与について詳細に検討する必要がある。

(2) 小括

1. CTX 投与により、投与後 12 時間から 1 日にかけて、*fad24* ならびに *hbo1* の発現が一過性に上昇した。
2. 血清飢餓により静止した筋芽細胞において、血清刺激により *fad24*, *hbo1* の発現が上昇した。

3. 血清飢餓により静止した筋芽細胞において、*fad24* 発現抑制により、血清刺激による S 期進入が阻害された。
4. *fad24* 発現抑制筋芽細胞では、血清飢餓時および血清刺激 8 時間後において、p27^{Kip1} の発現レベルがタンパク質レベルで高かった。

総 括

脂肪組織は単なるエネルギーの貯蔵器官ではなく、レプチンやアディポネクチンといった生理活性物質アディポカインを分泌し、エネルギーホメオスタシスの制御に寄与する重要な内分泌器官である (46)。また近年、熱産生を担うベージュ脂肪細胞が脂肪組織内に存在することが報告され、脂肪組織はエネルギー消費の場としても注目されている (47)。

脂肪組織の形成や肥満には、前駆脂肪細胞が分化することによる成熟脂肪細胞の増加が重要である。脂肪細胞分化の分子機構を解明することは、肥満やそれに伴う疾患の治療に大きく寄与すると考えられる。当研究室では、脂肪細胞分化初期の分子メカニズム解明を目指し、マウス株化培養細胞 3T3-L1 において、脂肪細胞分化誘導 3 時間後に発現が上昇する遺伝子を PCR subtraction 法により 102 クローン単離した (5, 6)。単離した遺伝子のうちいくつかは、これまでデータベースに登録のなかった新規遺伝子であった。これまでに、これらの新規遺伝子が脂肪細胞分化に重要な因子であることを報告している (7-11)。

また当研究室では、新規遺伝子の一つである *fad24* が脂肪細胞分化を正に制御することに加え、*fad24* 過剰発現マウスは脂肪組織において小型の脂肪細胞が増加し、糖代謝能が改善することを明らかにしている (21)。したがって、*fad24* は生体内においても脂肪組織の形成を正に制御し、糖代謝能に寄与する重要な因子であると考えられた。また、*fad24* が特に骨格筋で豊富に発現し、筋芽細胞 C2C12 の増殖を正に制御することを明らかにしている (22)。さらに、*fad24* 欠損ゼブラフィッシュは骨格筋の発生に異常を呈することが他のグループより報告されている (23)。したがって、*fad24* は骨格筋においても何らかの役割を担っていると考えられた。しかしながら、生体内における *fad24* の役割については未だ不明な点が数多く残されていた。そこで本研究では、全身性の *fad24* 欠損マウスを樹立、解析したところ、*fad24* が胚盤胞の形成に必須であることを明らかにした。また、骨格筋の再生過程に着目した検討を行い、*fad24* が p27^{Kip1} の発現制御を介してサテライト細胞の活性化に寄与することを示唆する結果を得た。これらの結果より、*fad24* は脂肪細胞分化のみならず、初期胚発生や骨格筋再生にも関与する重要な因子であることを明らかにした (Fig. 20)。

当研究室ではこれまでに、*fad24* が DNA 複製の制御を介して前駆脂肪細胞や筋芽細胞の細胞増殖を正に制御することを明らかにしている (20, 22)。FAD24 は、HBO1 を DNA 複製開始点にリクルートすることにより、DNA 複製を正に制御する。本研究により、*fad24* は静止した筋芽細胞の増殖再開を促進することが明らかとなった (Figs. 16, 17)。また、初期胚発生過程においても細胞増殖に寄与していることを示唆する検討結果を得た (Fig. 10)。これらの結果から、*fad24* は細胞増殖の制御を介して、脂肪細胞分化、初期胚発生ならびに骨格筋再生に寄与している可能性がある。一方で、*hbo1* 欠損マウスは胎生 10.5 日齢まで生存していることが報告されており (29)、FAD24 は初期胚発生過程において HBO1 以外の因子とともに機能している可能性が高い。このように、*fad24* は脂肪細胞分化、初期胚発生およびサテライト細胞活性化において、それぞれ異なるメカニズムにより機能しているの

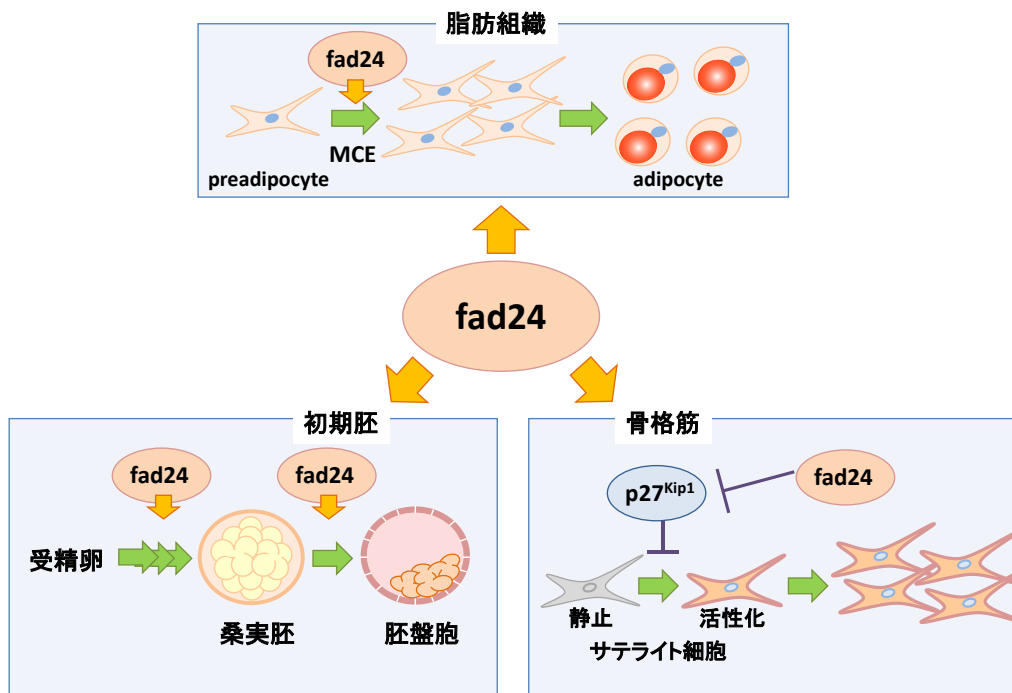


Fig. 20. The proposed model of the function of *fad24*.

ではないかと考えられる。また、本研究により、*fad24* は $p27^{Kip1}$ のタンパク質レベルに関与することが明らかとなった (Fig. 18C)。MCE においては、 $p27^{Kip1}$ が G1 期から S 期への移行に重要な役割を担うことが報告されている (48)。MCE において、*fad24* が $p27^{Kip1}$ の発現制御に寄与するか否かについても検討する必要がある。

これまでの知見より、*fad24* は様々な細胞種において細胞増殖を正に制御していると推測される。細胞増殖が密接に関係している疾患にがんがある。近年、乳がん組織や胃がん組織において、*fad24* の SNP ががんの発症リスクや治療薬の感受性に関係していることを示唆する論文が報告されている (12, 49)。したがって *fad24* は、がんの進行に寄与している可能性が考えられる。がんの増殖において *fad24* が担う機能を解析することにより、がんに対する新しい治療標的を発見する一助となることが期待される。

fad24 は、脂肪細胞分化過程初期に発現が上昇する (7)。また、本研究により、骨格筋の再生過程初期ならびに静止筋芽細胞の増殖再開時において発現が上昇することがわかった (Figs. 12, 15)。これらの結果から、*fad24* の機能はその発現量の増減によって制御されている可能性が考えられる。したがって初期胚発生過程においても、*fad24* の機能が必要とされる発生ステージにおいて、*fad24* が発現上昇しているかもしれない。本研究では、初期胚発生過程における *fad24* の発現変化を検討しようとしたが、初期胚から十分な RNA を得ることができなかった (data not shown)。今後、発生過程における *fad24* の発現変化について検討する必要がある。また、*fad24* の発現制御機構を解明することにより、*fad24* の機能制御に関する新たな知見が得られると考えられる。当研究室では現在、*fad24* のプロモーター領域の同定およびその活性に影響を与える因子の解析を進めている。

本研究では、受精卵が胚盤胞に発生するために *fad24* が必須であることを明らかとした。よって、何らかの原因で胎児が着床前に死亡する場合、*fad24* の発現または機能が正常に起こっていない可能性がある。また、本研究結果より、*fad24* は骨格筋再生を促進すると考えられた。遺伝性疾患の一つである筋ジストロフィーは、筋組織が徐々に壊死し、筋力低下が進行する疾患である。罹患期間が長期にわたると、サテライト細胞の活性化能、増殖能が低下し、筋再生能が落ちることが知られている (50)。このような増殖能が低下したサテライト細胞においては、*fad24* の発現または機能が低下しているかもしれない。今後、胎児の早期発生異常を呈する疾患や、筋再生能に異常を生じる疾患と、*fad24* との関連性について明らかとしていくことが重要である。

fad24 は脂肪組織、骨格筋のほか、肝臓や腎臓、心臓などユビキタスに発現している (7)。したがって、*fad24* は脂肪組織や骨格筋以外の組織においても、何らかの役割を担っている可能性がある。本研究で樹立した全身性 *fad24* ホモ欠損マウスは胎生致死であり、成体マウスにおける *fad24* 欠損の影響は検討できなかった。今後、時期特異的ならびに組織特異的 *fad24* 欠損マウスを樹立し、解析することによって、成体における *fad24* の役割について新たな知見が得られると考えられる。

以上、本研究において、*fad24* が初期胚発生過程において胚盤胞形成に必須の役割を担うことを明らかとした (Fig. 20)。また、C2C12 細胞を用いた検討により、*fad24* がサテライト細胞の活性化を介して骨格筋再生を正に制御していることを示唆する結果を得た。将来、*fad24* が制御する分子機構を標的とした新たな治療戦略を開発するため、肥満や、胎児の初期胚発生異常、筋疾患といった疾患と *fad24* との関連を明らかとしていくことが重要である。

結 論

1. *fad24* は胚盤胞の形成に必須である。
2. *fad24* は C2C12 細胞の増殖再開を正に制御する。

謝 辞

本研究を遂行するにあたって、終始温かいご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科教授 今川正良 先生に篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたって、熱心なご指導を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授 長田茂宏 先生、講師 西塚 誠 先生に深く感謝いたします。

ノックアウトマウス作製にあたり、共同研究を行うとともに温かいご指導を賜りました、大阪大学教授 伊川正人 先生に心より感謝いたします。

マウス初期胚の採取ならびにその性状解析を行うにあたり、親身にご指導、ご協力をいただきました名古屋市立大学大学院医学研究科教授 三好一郎 先生（現 東北大学教授）、衛生技師 宮本智美 先生に心より感謝いたします。

マウス組織切片の作製および解析を行うにあたり、熱心なご指導を賜りました、名古屋市立大学大学院医学研究科教授 鶴川眞也 先生、准教授 植田高史 先生に深く感謝いたします。

実験にご協力いただきました岸本圭史 博士をはじめ、名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野で出会った皆様に感謝いたします。

最後に、常日頃から激励、ご援助いただきました諸先生、友人、両親に深く感謝いたします。

引用文献

1. C. E. Lowe, S. O'Rahilly, J. J. Rochford (2010) Adipogenesis at a glance, *J. Cell Sci.* 124, 2681-2686.
2. Y. X. Wang (2010) PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases, *Cell Res.*, 20, 124-137.
3. A. G. Cristancho, M. A. Lazar (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 722-734.
4. M. S. Rodeheffer, K. Birsoy, J. M. Friedman (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*, *Cell*, 135, 240-249.
5. M. Imagawa, T. Tsuchiya, T. Nishihara (1999) Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 299-305.
6. M. Nishizuka, T. Tsuchiya, T. Nishihara, M. Imagawa (2002) Induction of Bach1 and ARA70 gene expression at early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells, *Biochem. J.*, 361, 620-633.
7. K. Tominaga, Y. Johmura, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) Fad24, a mammalian homolog of Noc 3p, is a positive regulator in adipocyte differentiation, *J. Cell Sci.*, 117, 6217-6226.
8. T. Hishida, T. Eguchi, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2008) A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion, *FEBS J.*, 275, 5576-5588.
9. K. Tominaga, C. Kondo, Y. Johmura, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) The novel gene fad104, containing a fibronectin type III domain, has a significant role in adipogenesis, *FEBS Lett.*, 577, 49-54.
10. K. Tominaga, T. Kagata, Y. Johmura, T. Hishida, M. Nishizuka, M. Imagawa (2005) SLC39A14, a LZT protein, is induced in adipogenesis and transports zinc, *FEBS J.*, 272, 1590-1599.
11. K. Tominaga, C. Kondo, T. Kagata, T. Hishida, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) The novel gene *fad158*, having a transmembrane domain and leucine-rich repeat, stimulates adipocyte differentiation, *J. Biol. Chem.*, 279, 33840-33848.
12. A. M. Mendes-Pereira, D. Sims, T. Dexter, I. Assiotis, I. Kozarewa, C. Mitsopoulos, J. Hakas, C. J. Lord, A. Ashworth (2012) Genome-wide functional screen identifies a compendium of genes affecting sensitivity to tamoxifen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2730-2735.
13. W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight (1988) The Leucine zipper: a

hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science*, 240, 1759-1764.

14. F. Neumann, P. Hemmerich, A. von Mikecz, H. H. Peter, U. Krawinkel (1995) Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells, *Nucleic Acids Res.* 23, 195-202.
15. J. H. Tan, Y. Kajiwar, L. Shahied, J. Li, J. G. McAfee, W. M. LeSturgeon (2001) The bZIP-like motif of hnRNP C directs the nuclear accumulation of pre-mRNA and lethality in yeast, *J. Mol. Biol.* 305, 829-838.
16. P. Milkereit, O. Gadal, A. Podtelejnikov, S. Trumtel, N. Gas, E. Petfalski, D. Tollervey, M. Mann, E. Hurt, H. Tschochner (2001) Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins, *Cell*, 105, 499-509.
17. H. Kühn, T. Hierlmeier, J. Merl, S. Jakob, A. Aguisa-Toure', P. Milkereit, Tschochner, H. (2009) The Noc-domain containing C-terminus of Noc4p mediates both formation of the Noc4p-Nop14p submodule and its incorporation into the SSU processome, *PLoS ONE*, 4, e8370.
18. Y. Zuang, Yu. Zhiling, X. Fu, C. Liang (2002) Noc3p, a bHLH protein, plays an integral role in the initiation of DNA replication in budding yeast, *Cell*, 109, 849-860.
19. C. R. Houchens, A. Perreault, F. Bachand, T. J. Kelly (2008) *Schizosaccharomyces pombe* Noc3 is essential for ribosome biogenesis and cell division but not DNA replication, *Eukaryot Cell*, 7, 1433-1440.
20. Y. Johmura, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2007) FAD24 acts in concert with histone acetyltransferase HBO1 to promote adipogenesis by controlling DNA replication, *J. Biol. Chem.*, 283, 2265-2274.
21. Y. Johmura, K. Watanabe, K. Kishimoto, T. Ueda, S. Shimada, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2009) Fad24 causes hyperplasia in adipose tissue and improves glucose metabolism, *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1656-1664.
22. Y. Johmura, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2008) FAD24, a regulator of adipogenesis, is required for the regulation of DNA replication in cell proliferation, *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 1092-1095.
23. K. B. Walters, M. E. Dodd, J. R. Mathias, A. J. Gallagher, D. A. Bennin, J. Rhodes, J. P. Kanki, A. T. Look, Y. Grinblat, A. Huttenlocher (2009) Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24, *Dev. Dyn.*, 238, 86-99.
24. A. Spruss, G. Kanuri, C. Stahl, S. C. Bischoff, I. Berqheim (2012) Metformin protects the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier

- function. *Lab. Invest.*, 92, 1020-32.
25. A. Nagy, M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer (2005) マウス胚の操作マニュアル (原著第三版) 山内一也、豊田裕、岩倉洋一郎、佐藤英明、鈴木宏志 訳 近代出版 (東京都)
 26. H. J. Lim, Y. Jeon, C. H. Jeon, J. H. Kim, H. Lee (2011) Targeted disruption of *Mcm10* causes defective embryonic cell proliferation and early embryo lethality, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1813, 1777-1783.
 27. T. Hamatani, M. G. Carter, A. A. Sharov, M. S. Ko (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev. Cell*, 6, 117-131.
 28. H. Chen, Z. Li, K. Haruna, Z. Li, Z. Li, K. Semba, M. Araki, K. Yamamura, K. Araki (2008) Early pre-implantation lethality in mice carrying truncated mutation in the RNA polymerase 1-2 gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 636-642.
 29. A. K. Kueh, M. P. Dixon, A. K. Voss, T. Thomas (2011) HBO1 is required for H3K14 acetylation and normal transcriptional activity during embryonic development, *Mol. Cell. Biol.* 31, 845-860.
 30. X. Shi, D. J. Garry (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease, *Genes Dev.*, 20, 1692-1708.
 31. J. G. Tidball (2011) Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration, *Compr. Physiol.*, 1, 2029-2062.
 32. L. Zeng, Y. Akasaki, K. Sato, N. Ouchi, Y. Izumiya, K. Walsh (2010) Insulin-like 6 is induced by muscle injury and functions as a regenerative factor, *J. Biol. Chem.*, 285, 36060-36069.
 33. T. Yoshida, T. S. Hug, P. Delafontaine (2014) Angiotensin type 2 receptor signaling in satellite cells potentiates skeletal muscle regeneration, *J. Biol. Chem.*, 289, 26239-26248.
 34. N. A. Dumont, C. F. Bentzinger, M. C. Sincennes, M. A. Rudnicki (2015) Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration, *Compr. Physiol.*, 5, 1027-1059.
 35. J. Ishibashi, R. L. Perry, A. Asakura, M. A. Rudnicki (2005) MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH₂- and COOH-terminal regions, *J. Cell Biol.*, 171, 471-482.
 36. K. Zhang, J. Sha, M. L. Harter (2010) Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells, *J. Cell Biol.*, 188, 39-48.
 37. C. J. Sherr, J. M. Roberts (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, *Genes Dev.*, 18, 2699-2711.
 38. S. Coats, W. M. Flanagan, J. Nouse, J. M. Roberts (1996) Requirement of p27Kip1

- for restriction point control of the fibroblast cell cycle, *Science*, 272, 877-880.
39. S. Kohno, Y. Yamashita, T. Abe, K. Hirasaka, M. Oarada, A. Ohno, S. Teshima-Kondo, A. Higashibata, I. Choi, E. M. Mills, Y. Okumura, J. Terao, T. Nikawa (2012) Unloading stress disturbs muscle regeneration through perturbed recruitment and function of macrophages, *J. Appl. Physiol.*, 112, 1773-1782.
 40. P. K. Shireman, V. Contreras-Shannon, O. Ochoa, B. P. Karia, J. E. Michalek, L. M. Mcmanus (2007) MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration, *J. Leukoc. Biol.*, 81, 775-785.
 41. C. O. Martinez, M. J. McHale, J. T. Wells, O. Ochoa, J. E. Michalek, L. M. McManus, P. K. Shreman (2010) Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR-2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 299, R832-R842.
 42. T. Kamura, T. Hara, M. Matsumoto, N. Ishida, F. Okumura, S. Hatakeyama, M. Yoshida, K. Nakayama, K. I. Nakayama (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27^{Kip1} at G1 phase, *Nat. Cell Biol.*, 6, 1229-1235.
 43. M. K. Connor, R. Kotchetkov, S. Cariou, A. Resch, R. Lupetti, R. G. Beniston, F. Melchior, L. Hengst, J. M. Slingerland (2003) CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27^{Kip1} involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis, *Mol. Biol. Cell*, 14, 201-213.
 44. E. Susaki, K. I. Nakayama (2007) Multiple mechanisms for p27^{Kip1} translocation and degradation, *Cell Cycle*, 6, 3015-3020.
 45. H. Jäkel, I. Peschel, C. Kunze, C. Weinl, L. Hengst (2012) Regulation of p27^{Kip1} by mitogen-induced tyrosine phosphorylation, *Cell Cycle*, 11, 1910-1917.
 46. P. E. Scherer (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ, *Diabetes*, 55, 1537-1545.
 47. V. Peirce, S. Carobbio, A. Vidal-Puig (2014) The different shades of fat, *Nature*, 510, 76-83.
 48. Y. M. Patel, M. D. Lane (2000) Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27, *J. Biol. Chem.*, 275, 17653-17660.
 49. L. J. Yuan, T. B. Jin, X. L. Du, Q. Wang, R. Donq, S. Z. Wang, Y. Cui, C. Chen, J. G. Lu (2012) Polymorphisms of tumor-related genes IL-10, PSCA, MTRR and NOC3L are associated with the risk of gastric cancer in the Chinrdr Han population, *Cancer Epidemiol.*, 36, e366-372.
 50. D. Briggs, J. E. Morgan (2013) Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment—relevance for therapy, *FEBS J.*, 280, 4281-4293.